

Etude de la germination
des pycnidiospores
de *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.,
agent du coître de la vigne.

Thèse présentée à la faculté des Sciences
de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de docteur
par Michel Aragno
licencié es sciences, orientation biologie
de l'Université de Neuchâtel.

1975

La faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel, sur le rapport des membres
du jury,

MM. les professeurs
Ch. Terrier, G. Turian (Genève)
et F. Mangelot (Nancy)

autorise l'impression de la présente thèse sans exprimer d'opinion sur les propositions
qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 18 août 1975

Le doyen: *Willy Form*



Separatdruck aus „Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft“
1973, Band 83, Nr. 3 (Ausgegeben am 25. Februar 1974)
1974, Band 84, Nr. 1 (Ausgegeben am 30. November 1974)
1974, Band 84, Nr. 4 (Ausgegeben am 30. September 1975)

Etude de la germination des pycnidiospores de *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd., agent du coître de la vigne. I. Conditions de la germination

par Michel Aragno

Laboratoire de Cryptogamie
Institut de Botanique de l'Université Neuchâtel

Manuscrit reçu le 3 août 1973

Introduction

La germination est l'ensemble des phénomènes transformant une spore, une graine, un sclérote dormants en cellules végétatives à activité métabolique élevée, dont les divisions vont reprendre et former, directement ou indirectement, un organisme semblable à celui qui leur a donné naissance. Une telle transformation se manifeste par des événements biochimiques, des modifications du métabolisme et de la structure cellulaire. Il s'agit en fait, chez les champignons, du premier pas de la morphogénèse.

Chez les champignons parasites, tout ou partie du cycle vital doit se dérouler en fonction de celui de l'hôte. La période d'infectabilité peut être très limitée dans le temps; les spores doivent être alors présentes et prêtes à germer.

Comme nous le verrons plus loin, la période d'infectabilité des raisins par *Coniella diplodiella* est très étroite. Pratiquement, elle comprend les douze heures qui suivent une chute de grêle, à l'époque de la maturation des raisins; suivant les régions, il peut ne pas grêler chaque année à un endroit donné!

Ajoutées aux implications de la survie des spores dans un environnement défavorable, celles de l'extrême étroitesse de la période d'infectabilité motivent l'intérêt d'une étude de la germination chez ce parasite, dont les pycnospores assument à elles seules les fonctions de multiplication, de transmission et de conservation de l'espèce. Sa culture est en outre aisée, et il fructifie abondamment en milieu synthétique.

A côté de l'étude en soi de la germination, nous nous sommes donc intéressé, dans ce travail, aux relations entre la germination et le parasitisme, condition particulière de la biologie et de l'écophysiologie de ce champignon.

Coniella diplodiella (Speg.) Pet. et Syd. (1926) [= *Phoma diplodiella* Speg. (1878), *Coniothyrium diplodiella* (Speg.) Sacc. (1884)] appartient aux *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*), ordre des *Sphaeropsidales*, famille des *Sphaeropsidaceae*. C'est l'agent d'une maladie de la vigne, nommée suivant les régions et les auteurs, coïtre, maladie de la grêle, rot livide, rot blanc. Il forme, *in vivo* et *in vitro*, des pycnides typiques, glabres, à paroi mélanisée et pourvues d'un ostiole. Les spores, unicellulaires, sont produites en succession centripète à l'extrémité de conidiophores émergeant d'un massif de cellules au fond de la pycnide. Leur paroi est tout d'abord incolore, puis brunit par la suite. Elles apparaissent noires en masse.

Le coïtre, ou maladie de la grêle, est connu depuis longtemps dans le vignoble suisse romand. La première mention écrite est un chapitre de l'ouvrage de Reymondin (1798), intitulé „*De la maladie des raisins, suite de la grêle, et des moyens pour en diminuer les ravages*“. A cette époque, l'agent de la maladie n'avait pas été étudié; ce n'est qu'en 1878 que Spegazzini décrit, en Italie, sous le nom de *Phoma diplodiella*, un champignon parasite des raisins auquel Dufour (1888) identifiera l'agent du coïtre. Par la suite, ce champignon a été signalé en France et aux Etats-Unis (Viala et Ravaz, 1888; Viala, 1893), en Hongrie (Istvanffi, 1902) etc.

Le premier, Dufour (1888) a expliqué la relation directe entre la grêle et l'apparition de la maladie. En ce temps-là, la lutte consistait surtout en l'ablation des parties malades. Les produits utilisés contre les autres parasites (sels de cuivre en particulier) étant à peu près inefficaces (Terrier, 1949), le vigneron était fort démuné dans sa lutte contre le coïtre; cela a suscité de nombreux travaux, en particulier à la station fédérale d'essais agricoles de Lausanne.

Faes et Staehelin (1922, 1923a, 1923b, 1935) étudient de façon plus approfondie la biologie de *C. diplodiella*, l'émission des spores, les conditions de germination et de croissance. Ils montrent, entre autres, l'action de la température, du pH et de la concentration en sucre sur la germination; ils indiquent que les spores germent rapidement et abondamment dans le jus de raisin, lentement et mal dans l'eau de pluie ou de fontaine. Ils entrevoient aussi, sans pousser plus loin leur étude, qu'une proportion suffisante d'acides organiques est utile à la germination et à la croissance.

La culture pure *in vitro*, sur milieux naturels, avait déjà été réalisée par Istvanffi (1902), mais Terrier (1949) a, le premier, réussi à cultiver et à faire fructifier *C. diplodiella* sur milieu synthétique. Ses travaux ont servi de base à toute une série de recherches sur la biologie et la lutte contre ce champignon.

Turian et Staehelin (1954) ont repris les travaux de Terrier; bien qu'orientant principalement leurs efforts vers la recherche de substances antiparasitaires, ils précisent les besoins nutritifs minima du champignon et étudient, par des modèles en laboratoire, la biologie du champignon dans le sol.

Turian (1954a) étudie plus en détail les besoins minima du parasite en facteurs de croissance, et en particulier les besoins de biotine, en relation avec la source d'azote.

Depuis cette époque, les travaux ont été consacrés à la recherche et à l'essai de fongicides, pour détruire les spores dans le sol — traitement préventif (Turian, 1954b; Turian et Leyvraz, 1954; Turian et Staehelin, 1955) ou sur les grappes, après la grêle — traitement curatif (Staehelin et al., 1956; Bolay et Corbaz, 1961; Bolay, 1963; Bolay et Simon, 1964).

Récemment, Locci et Quaroni (1972) ont publié une étude préliminaire sur des souches italiennes de *C. diplodiella*. Ils notent des différences sensibles avec les résultats obtenus par les auteurs suisses, en particulier sur la germination (elle se produit dans l'eau, les spores ne germent presque plus à pH 3,0). Toutefois, les conditions de cette étude, en particulier le milieu de culture, la maturité et la technique de préparation des spores, ne sont pas précisées; une comparaison rigoureuse est donc impossible.

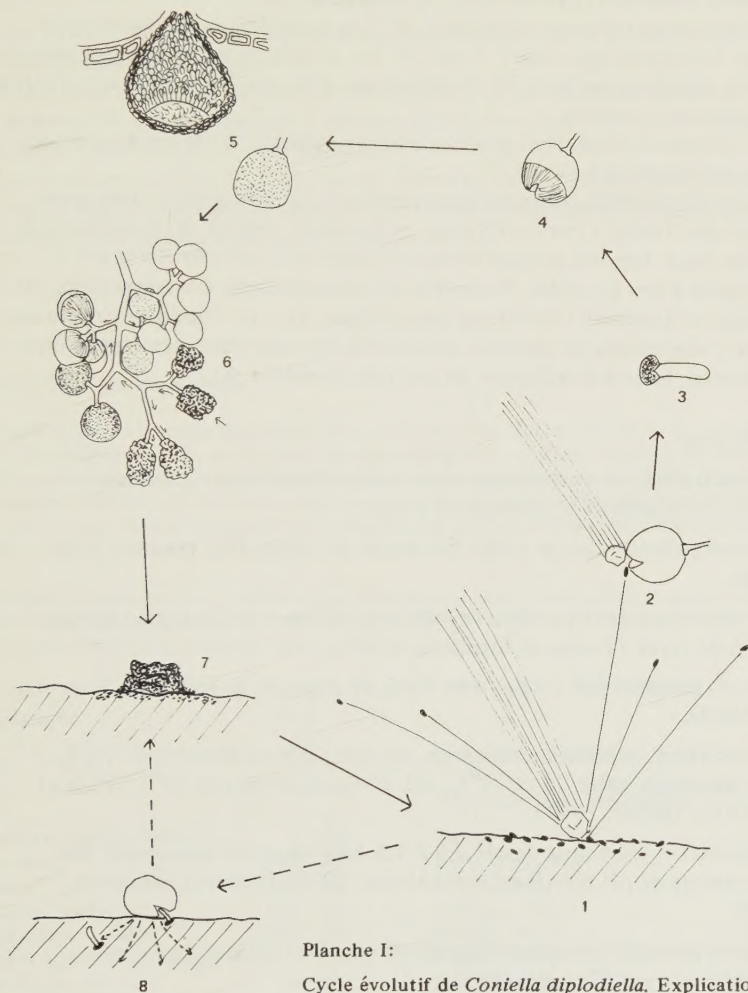


Planche I:

Cycle évolutif de *Coniella diplodiella*. Explications: cf texte.

Cycle évolutif de Coniella diplodiella

Les spores de *C. diplodiella* se maintiennent dormantes dans le sol des vignes. Suivant les conditions écologiques, on peut en trouver jusqu'à 2000 par g de terre (Turian et Staehelin, 1954).

Du sol, elles sont projetées par les éclaboussures, lors de précipitations (planche I, 1), sur les raisins. Le mycélium n'étant pas à même de percer la cuticule, la pénétration se fait par une blessure, dans la grande majorité des cas à la suite d'une chute de grêle (planche I, 2). D'autres causes, éclatement physiologique, blessures occasionnées par des oiseaux ou des insectes, peuvent donner lieu à des infections sporadiques (Staehelin et al., 1956).

Une fois en contact avec la pulpe du raisin, les spores germent (planche I, 3) et l'infection débute. 12 heures après, en moyenne, elle est irréversible. Le traitement doit donc être effectué dans cet intervalle.

Le mycélium envahit le grain (planche I, 4). Les pycnides apparaissent entre l'épiderme et la cuticule (planche I, 5 a et b). Par la rafle, le mycélium envahit peu à peu toute la grappe (planche I, 6). Il suffit donc d'un grain infecté pour détruire complètement cette dernière.

Les grains coitrés se dessèchent précocement et tombent sur le sol dans lequel les spores se dispersent (planche I, 7).

La possibilité d'un développement saprophytique du champignon dans le sol a été évoquée par Terrier (1949) et Turian et Staehelin (1954). Il est concevable que des grains sains, tombés accidentellement, puissent s'infecter sur le sol et donner naissance à des pycnides. Toutefois, et contrairement à la supposition de Terrier, Turian et Staehelin (1954) ont montré que, dans les conditions normales, les spores de *C. diplodiella* ne germent pas dans le sol, sauf peut-être à proximité d'un grain tombé, suite à la diffusion de son jus (planche I, 8).

Le problème posé

Avant notre travail, les connaissances sur la physiologie de la germination des spores de *C. diplodiella* se résumaient à ceci:

1. Les spores germent dans la pulpe des grains de raisin; elles germent aussi dans le moût.

2. Les spores ne germent pas dans la terre, en l'absence de facteurs apportés par les grains de raisin (Turian et Staehelin, 1954).

3. Les spores germent peu ou pas dans l'eau de pluie ou de fontaine (Faes et Staehelin, 1935).

4. La germination, comme la croissance, est très lente au-dessous de 15°C, atteint son maximum entre 24 et 27°C, et s'arrête au-dessus de 34°C (Faes et Staehelin, 1935; Terrier, 1949).

5. La germination est bonne de pH 2.9 à 5.9 dans du moût tamponné. Elle est nulle au-dessus de pH 6.6 (Faes et Staehelin, 1935; Turian et Staehelin, 1954).

6. Les spores peuvent être conservées au sec pendant 20 ans sans perdre leur pouvoir germinatif (Terrier, 1949).

Nous ne pouvons tenir compte ici des résultats de Istvanffi (1902), les conditions dans lesquelles cet auteur a travaillé n'étant pas suffisamment précisées. Il donne en revanche une bonne description morphologique de la germination.

Le champignon germant en présence de jus de raisin, mais pas dans le sol, on peut formuler deux hypothèses:

a) Le développement des spores dans le sol est bloqué par un facteur extérieur (dormance induite au sens de Sussman et Halvorson (1966): pH, agents fongostatiques diffus (Turian et Staehelin, 1954; Dobbs et Hinson, 1953).

b) Les spores présentent une dormance constitutive, au sens de Sussman et Halvorson (1966), et un ou plusieurs facteurs activateurs, présents dans la pulpe des raisins, sont nécessaires à la germination.

En d'autres termes, la dormance des spores dans le sol est-elle de nature *écologique* ou *physiologique*?

Dans un sol neutre ou alcalin, ou dans l'eau de pluie ou de fontaine, la dormance des spores peut s'expliquer par le pH trop élevé du milieu (Turian et Staehelin, 1954). Mais est-ce bien le seul facteur limitant?

Nous nous proposons, dans ce travail, d'étudier les causes de cette dormance, les conditions nécessaires à la germination des spores, et les relations de spécificité entre le parasite et son hôte lors de la germination.

Matériel et méthodes générales

Souche utilisée: *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd., souche NEU F 17 = Changins No 5, isolée d'un grain de raisin coïtré de la var. *chasselas*, ct. Vaud, vignoble du Dézaley, 1955, leg. H. Aebi. Cette souche, mise aimablement à notre disposition par le service de mycologie de la station fédérale de recherches agronomiques de Changins, a été utilisée pour l'ensemble de notre travail. Nous avons vérifié sa pathogénicité par essai d'infection de grappillons, en laboratoire.

Milieu de culture pour la croissance du champignon. Nous avons utilisé le milieu suivant, désigné plus loin par „milieu F-T“. Il correspond à la formule de Fries, adaptée selon Turian (1954a) et complété d'acide tartrique.

Glucose	40 g		
L-asparagine	2 g		
KH ₂ PO ₄	1 g		
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g		
CaCl ₂	0.1 g		
NaCl	0.1 g		
Solution d'oligoéléments*	1 ml		
Thiamine	500 µg		
Biotine	10 µg		
Acide L(+)-tartrique	150 mg		
Eau distillée qsp	1000 ml		
Ramené à pH 4.5 par NaOH 1 N			
Agar (Oxoid No 1)	14 g		
		* Solution d'oligoéléments:	
		Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	100 mg
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	40 mg
		FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1 g
		CuSO ₄ · 5 H ₂ O	400 mg
		MnSO ₄ · H ₂ O	60 mg
		ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	800 mg
		Eau distillée	1000 ml

Le milieu est réparti en tubes de 18 mm de diamètre, à raison de 8 ml par tube. Il est ensuite tyndallisé (chauffé trois fois de suite à 24 heures d'intervalle, à 100° C pendant 30 minutes). Les tubes sont alors mis à refroidir en position inclinée, à 12° de l'horizontale.

Préparation des spores. Les cultures (pour chaque série d'expériences, au moins trois tubes d'une même série de repiquages) sont inondées par 2–3 ml d'une solution stérile de NaCl 50 mM, puis raclées légèrement au moyen d'une anse de platine stérilisée, de façon à mettre les spores en suspension. Celle-ci est ensuite filtrée sur une triple couche de gaze, pour éliminer les débris de pycnides et les morceaux d'agar, puis centrifugée à 400 g pendant 5 minutes. On jette le surnageant, on remet le culot en suspension dans 10 ml environ d'une solution stérile de NaCl 50 mM; on centrifuge à nouveau 5 minutes à 400 g. On répète une deuxième fois ce lavage. Le culot final est ensuite mis en suspension dans le milieu désiré, à la concentration voulue.

Les spores de *C. diplodiella* sont des myxospores; leur immersion n'exige donc pas de traitement préalable par un mouillant. Par contre, en suspension aqueuse, elles flocculent après quelques heures ou se collent aux parois du récipient, rendant ainsi l'observation impossible. L'étude de la germination en milieu liquide agité a donc été abandonnée.

Germination en goutte pendante. Une goutte de suspension de spores (env. 5.10^5 spores/ml) dans le milieu adéquat est déposée au milieu d'un couvre-objet de 24 x 24 mm, préalablement lavé au mélange chromique, rincé trois fois à l'eau distillée, puis à l'alcool. La lame est placée, goutte en bas, sur une chambre humide, composée d'un cylindre de verre de 18 mm de diamètre intérieur et de 5 mm de haut, collé à l'araldite sur une lame porte-objets. L'étanchéité est assurée au moyen de vaseline blanche. Par cette méthode, l'observation directe est aisée; elle permet de travailler à n'importe quel pH. Elle a aussi des inconvénients:

- 1) La quantité de milieu est très faible, de l'ordre de 10 μ l, et une trace d'impureté peut avoir des conséquences importantes.
- 2) Les spores tendent à se rassembler au centre de la goutte, rendant parfois difficile la lecture des résultats.
- 3) Il est impossible, sans un dispositif spécial, de modifier l'environnement gazeux à volonté.

Cette méthode a toutefois été utilisée avec profit quand les autres n'étaient pas applicables.

Germination sur agar, méthode de la „double couche“. Le milieu de germination est préparé à une concentration égale aux 9/8 de la concentration finale désirée. Il est gélosé à 1,4% et, sauf spécification, ramené à pH 4.5 par NaOH ou HCl. On le distribue en boîtes de Petri de 5 cm, stériles (Millipore) à raison de 8 ml par boîte.

Les spores, lavées, sont suspendues à raison d'environ 5.10^5 par ml dans une solution de NaCl 50 mM, gélosée à 1%, fondue et maintenue liquide à 42° C. Cette suspension est coulée sur les milieux de germination, 1 ml par milieu.

Par cette méthode, les inconvénients de la goutte pendante sont évités; les spores restent en place, et le volume total du milieu de germination est beaucoup plus élevé, ce qui minimise les conséquences d'une souillure. En outre, la boîte peut être placée ouverte dans un récipient où l'on peut créer l'environnement gazeux désiré.

Cette méthode permet aussi d'avoir toutes les spores presque au même niveau dans le champ du microscope. Pour éviter la formation de buée lors de l'observation, on dépose sur l'agar une lamelle couvre-objet.

Les inconvénients sont:

- 1) Les substances actives du milieu de germination doivent diffuser dans la couche supérieure, et le temps de germination est un peu prolongé.
- 2) La présence d'agar, qui pourrait avoir des effets imprévus.

Lecture des résultats. Pour chaque essai, le pour-cent de germination est établi sur un total d'au moins 200 spores. Toutes les spores présentes dans un champ microscopique sont comptées, sauf celles qui, manifestement, sont mortes (spores brisées, ou optiquement vides).

L'observation se fait à un grossissement de 400 fois.

Nous considérons comme germée toute spore dont la paroi mélanisée est rompue par le gonflement. Pour les spores non mélanisées, le critère est l'apparition nette du tube germinatif.

Sauf indication contraire, chaque résultat exprimé dans ce travail est la moyenne de trois essais, effectués simultanément dans les mêmes conditions, avec la même population de spores.

Nous définissons le *temps moyen de germination* comme le temps nécessaire pour que la moitié des spores susceptibles de germer aient rompu leur paroi mélanisée, et la *vitesse moyenne de germination* comme l'inverse de ce temps (en h^{-1}).

L'analyse statistique de la répartition des résultats de chaque expérience (en % de germination) autour de la moyenne des trois essais nous a permis d'établir les différences significatives minimum ($p \geq 0,99$) entre deux résultats expérimentaux, moyennes de trois essais chacun:

a) différence d'au moins 7% entre les résultats de deux expériences, s'ils sont inférieurs l'un et l'autre à 25% germination.

b) différence d'au moins 12% entre les résultats de deux expériences, si l'un au moins est compris entre 25 et 75% germination.

c) différence d'au moins 6% entre les résultats de deux expériences, s'ils sont supérieurs l'un et l'autre à 75% germination.

Résultats

1. Essais préliminaires

Quelques essais préliminaires vont nous permettre de préciser le problème posé et l'orientation ultérieure de ce travail. Faut-il rechercher une inhibition de la germination par le sol, ou une activation par la pulpe de raisin?

On fait germer, en chambre humide, des spores d'une culture âgée de 1 mois. Incubation: 24 heures à 27° C.

Milieu:	% germination:
Moût de raisins 20%, pH 3.5	98
Eau distillée	0
NaCl 0.9%	0
Tampon glycine — HCl 50 mM, pH 3.5	2
Tampon citrate 50 mM, pH 4.0	3

Conclusions: les conditions extérieures (pH, inhibition par des agents fongistatiques du sol) ne suffisent pas à expliquer la dormance des spores. Celles-ci doivent trouver dans le jus de raisin un ou plusieurs facteurs responsables de leur activation.

2. Conditions physicochimiques externes de la germination

Dans la nature, la pulpe des raisins blessés est le substrat où s'effectue la germination des spores de *C. diplodiella*. Expérimentalement, le moût de raisin, même dilué et stérilisé, permet une excellente germination. Aussi est-ce dans un tel milieu, à base de jus de raisin de la var. *chasselas*, que nous allons étudier l'influence des facteurs physicochimiques externes, ou écologiques, sur la germination, pour déterminer les conditions optimales de celle-ci.

2.1 Le pH

Nous avons étudié l'effet du pH sur la germination, en chambre humide, avec 20% de moût de raisin dans les tampons 50 mM suivants:

de pH 1,4 à pH 2,65 :	HCl - KCl
de pH 2,65 à pH 3,6 :	Glycine - HCl
de pH 3,6 à pH 5,65 :	Citrate - phosphate
de pH 5,65 à pH 7,4 :	Phosphate

La cinétique a été établie pour chaque valeur de pH étudiée, ce qui permet d'estimer la vitesse moyenne de germination (fig. 1).

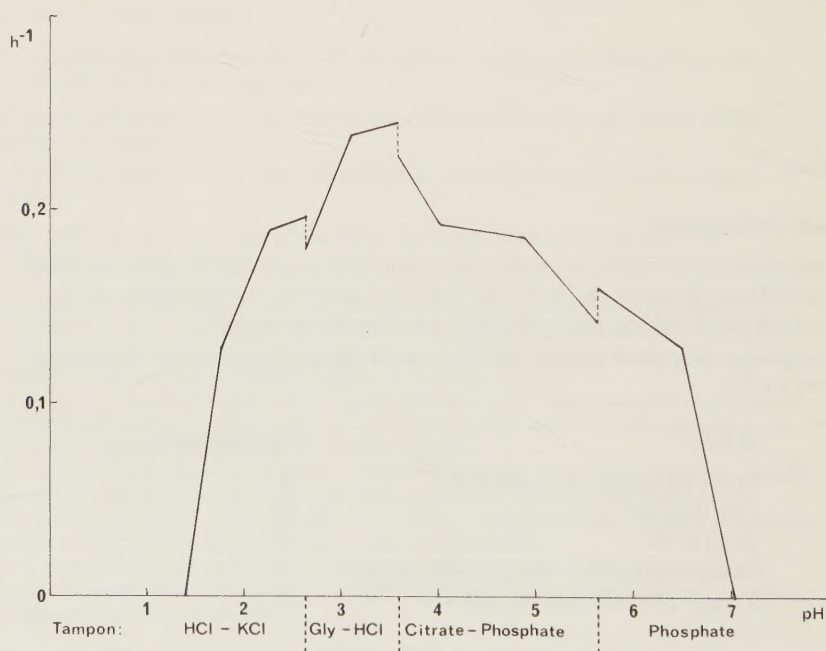


Fig. 1:

Effet du pH sur la germination dans le moût dilué.
Vitesse de germination (en h⁻¹) en fonction du pH.

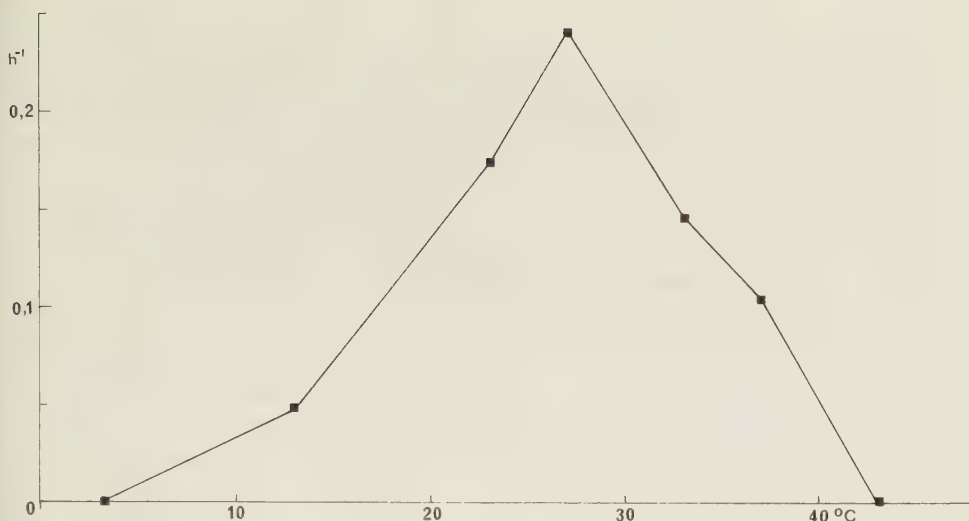


Fig. 2:

Effet de la température sur la germination.

Vitesse de germination (en h^{-1}) en fonction de la température.

La plus grande vitesse moyenne est atteinte, dans ces conditions, aux pH 3,1 et 3,6. De pH 2,2 à pH 4,9, la vitesse est presque aussi élevée, et ne descend pas au-dessous de $0,18 h^{-1}$. Les spores ne germent plus à pH 1,4 et au-dessus de pH 7,02.

L'optimum comprend le domaine de pH du milieu naturel (environ pH 2,2–2,4 à fin juillet, et pH 3,1–3,4 à l'époque de la vendange). Il s'étend au-delà jusqu'à pH 5. A la neutralité, toutefois, la germination est bloquée. Ces résultats confirment, en les précisant, ceux obtenus par Faes et Staehelin (1935) et par Turian et Staehelin (1954).

2.2 La température

La température a une grande importance dans les conditions naturelles. Selon Terrier (1949), à l'époque de la maturité des raisins, quand les dégâts dûs au coïtre sont moindres, le facteur limitant du développement de *C. diplodiella* est la température, non la teneur en sucre. Nous avons donc étudié la germination, dans du moût dilué, des spores de *C. diplodiella* à différentes températures.

Milieu employé: moût 20% + tampon glycine-HCl 50 mM, pH 3,5.

Technique de germination: goutte pendante, en chambre humide.

Résultats: fig. 2. L'optimum est ici très marqué, à $27^{\circ}C$, ce qui confirme les résultats de Terrier (1949). A $37^{\circ}C$, la germination a encore lieu, si l'on considère comme germée une spore dont la paroi mélanisée est rompue par le gonflement. Mais il n'y a plus, à cette température, de différenciation du tube germinatif; la croissance apicale est bloquée.

Enfin, à $3^{\circ}C$ comme à $43^{\circ}C$, les spores ne germent plus en 48 h. Toutefois, ces températures ne sont pas létales.

2.3 La pression osmotique

On sait (Terrier, 1949) que *C. diplodiella* est capable de se développer sur des raisins mûrs à de fortes concentrations de sucre, 170 g/l par exemple, ce qui, compte tenu des autres substances en solution, correspond à une pression osmotique de 25 atmosphères env. Avant la maturité, la pression osmotique est plus basse. Par exemple, sur la base de la composition des raisins *chasselas* en sucres, acides tartrique et malique, en 1935 (Benvegnin et al., 1947) on peut l'estimer à 12 atm. environ le 19 août, et à 25 atm. à maturité (10 octobre). Les spores exigent-elles pour germer une pression osmotique élevée, ou y sont-elles simplement tolérantes?

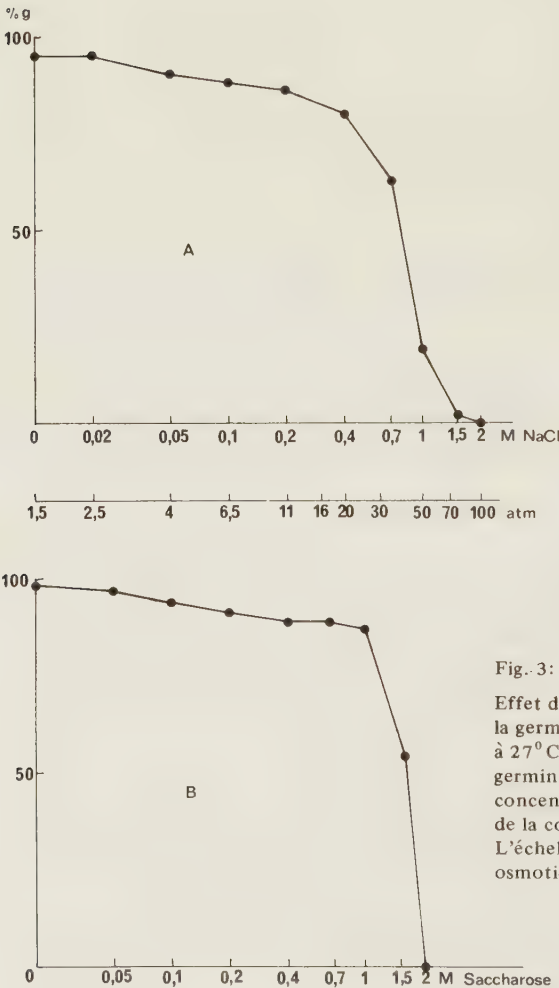


Fig. 3:

Effet de la pression osmotique sur la germination. % de germination en 24 h, à 27°C, dans le milieu minimum de germination. A: en fonction de la concentration de NaCl; B: en fonction de la concentration de saccharose. L'échelle médiane indique les pressions osmotiques correspondantes.

Milieu employé: acide tartrique – NaOH 50 mM pH 4,0, + NaCl ou saccharose à la concentration voulue. Nous avons utilisé ici le milieu minimum décrit plus loin, de façon à avoir une pression osmotique minimale la plus faible possible, ici 1,5 atm. environ.

Technique de germination: goutte pendante, en chambre humide. On mesure le % de germination en 24 heures, à 27° C.

Résultats: fig. 3, A et B. Une pression osmotique élevée n'est pas nécessaire à la germination des spores de *C. diplodiella*. Celle du milieu minimum suffit.

La germination en 24 heures est abaissée à 50% par une concentration de NaCl de 800 mM environ, et par une concentration de saccharose de 1,6 M environ, ce qui correspond à la même pression osmotique théorique. Il semble donc bien que ce soit ce phénomène qui limite ici la germination, et non un effet inhibiteur propre à l'une ou l'autre de ces substances.

La pression osmotique est nettement inhibitrice au-dessus de 25 atm. environ. Celle des raisins *chasselas*, sous nos climats, correspond donc au maximum tolérable pour assurer une bonne germination.

2.4 Composition de l'environnement gazeux

Dans l'air, deux gaz principalement sont susceptibles d'être utilisés par *C. diplodiella*: l'oxygène et l'anhydride carbonique. Nous allons donc essayer de faire germer les spores en l'absence de l'un ou l'autre de ces gaz.

2.4.1 Germination en anaérobiose

Chez de nombreux champignons, l'oxygène est absolument nécessaire à la germination, ou au moins à son achèvement. Toutefois, les spores de certaines espèces germent aussi bien en anaérobiose (Lin, 1940). Dans d'autres cas, l'achèvement de la germination n'est pas possible en anaérobiose, mais certaines phases du phénomène ne nécessitent pas la présence d'oxygène, comme chez *Mucor rouxiana* et *M. hiemalis* (Sussman et Halvorson, 1966). C'est aussi le cas des ascospores de *Neurospora tetrasperma* (Goddard, 1935; Sussman et al., 1966).

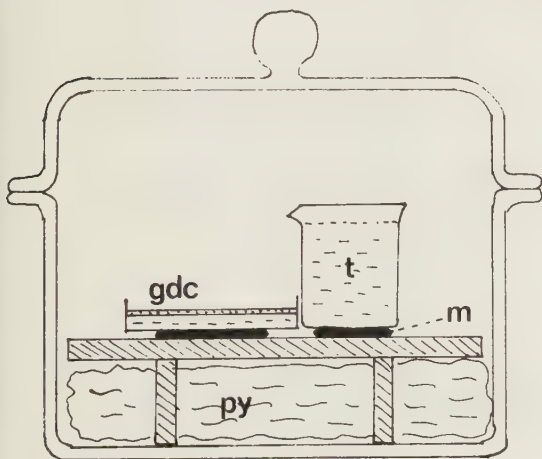


Fig. 4:

Schéma du dispositif pour l'étude de la germination en anaérobiose. gdc: système de germination en double couche, milieu = NaCl 50 mM gélosé, $5 \cdot 10^5$ spores/ml dans la couche supérieure; t: solution de tampon acide tartrique – NaOH 50 mM, pH 4.5; m: mastic; py: coton imbibé de pyrogallol + K_2CO_3 .

Sussman et Halvorson (1966) insistent sur une difficulté technique de cette étude: dans un appareil à cultures anaérobies, l'oxygène ne peut être enlevé instantanément. Aussi les tous premiers stades de la germination se déroulent en présence d'une quantité décroissante, mais non négligeable, de ce gaz. Nous avons alors procédé comme suit (fig. 4):

Les spores ont été placées, selon la méthode „agar double couche“, sur une base gélosée ne contenant que NaCl 50 mM. La boîte ainsi préparée (gdc) est placée dans le récipient à culture anaérobie, maintenue au fond par un peu de mastic (m). A côté, on place, maintenu de la même manière, un petit becher rempli de milieu de germination (t), dans nos essais une solution d'acide tartrique 50 mM ramenée à pH 4.5 par NaOH (voir plus loin).

Le milieu de germination est versé sur les spores, en inclinant le récipient, après le temps nécessaire à l'établissement de l'anaérobiose.

Celle-ci a été obtenue par deux méthodes: pyrogallol + K_2CO_3 , et méthode de Brewer (où l'oxygène est éliminé par réaction avec l'hydrogène, en présence d'un catalyseur au Pd) au moyen des appareils Gaspak (BBL) (Brewer et Allgeier, 1966).

Incubation: à 27°C. Lecture des résultats: 24 heures après l'introduction du milieu de germination.

Résultats:	% de germination en 24 h	
	en anaérobiose	à l'air ambiant
Méthode au pyrogallol:	31	94
Méthode de Brewer:	15	85

Il y a donc, dans ces conditions, une nette inhibition du phénomène global.

2.4.2 Germination en absence de CO_2

L'anhydride carbonique est nécessaire à la germination des spores de certains champignons, comme *Aspergillus niger* (Yanagita, 1957).

Ici, encore plus que pour l'anaérobiose, il est difficile d'assurer l'absence complète de CO_2 dans le milieu. Ce gaz est un produit de la respiration des spores; il est possible qu'elles le réutilisent immédiatement, avant qu'il n'ait été éliminé dans la phase gazeuse.

Technique de germination: comme pour l'anaérobiose. On fait passer à travers le récipient, muni de deux tubulures opposées, un courant d'air débarrassé de CO_2 sur KOH conc. et saturé d'humidité. Une solution de $Ba(OH)_2$ nous permet de contrôler l'absence de CO_2 dans le courant d'air.

Le milieu est versé sur les spores 1 h après la mise en marche de l'appareil. Lecture des résultats: 24 heures après l'introduction du milieu de germination. Un essai parallèle est fait à l'air ambiant.

Résultats:	% de germination en 24 h
Air sans CO_2	98
Air ambiant	98

Les spores peuvent donc germer en absence de CO_2 dans la phase gazeuse. Mais on ne peut savoir si elles réutilisent immédiatement celui qu'elles produisent par la respiration.

3. Recherche d'un milieu minimum de germination

Des essais préliminaires nous ont montré que, outre des conditions physico-chimiques externes favorables, un ou plusieurs facteurs présents dans le moût de raisins étaient nécessaires à la germination des spores de *C. diplodiella*.

En nous basant sur la composition du moût en sucres et en acides organiques (Kliewer, 1966) ainsi que sur celle du milieu F-T, nous avons préparé un milieu synthétique (tableau 1) dans lequel nous avons essayé de faire germer les spores de *C. diplodiella* (goutte pendante en chambre humide).

Ce milieu synthétique a, comme le moût, la propriété de faire germer la quasi totalité des spores de *C. diplodiella* (fig. 5). La germination est un petit peu plus lente, mais les graphes de cinétique sont assez voisins pour qu'on puisse supposer que le ou les facteurs nécessaires à la germination des spores de *C. diplodiella* et présents dans le moût le sont aussi dans le milieu synthétique.

Tableau 1:

Milieu synthétique pour la germination

Glucose	20 g
Fructose	20 g
Saccharose	0.2 g
Raffinose	0.2 g
Melibiose	0.02 g
Galactose	0.02 g
Acide L(+)tartrique	0.8 g
Acide DL malique	0.8 g
Acide citrique	0.1 g
Acide oxalique	0.04 g
Tartrate d'ammonium	0.6 g
Asparagine	0.3 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
NaCl	0.1 g
CaCl_2	0.1 g
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	100 μg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	40 μg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	400 μg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	60 μg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	800 μg
Thiamine.HCl	100 μg
Biotine	1 μg
Acide p-aminobenzoïque	10 μg
Riboflavine	10 μg
Pantothénate de Ca	40 μg
Nicotinamide	40 μg
Inositol	40 μg
Acide folique	1 μg
Acide ascorbique	1 mg
Acide β -indolyl-acétique	20 μg
Tampon Glycine — HCl	50 mM, pH 3.5
Eau distillée	ad 1000 ml

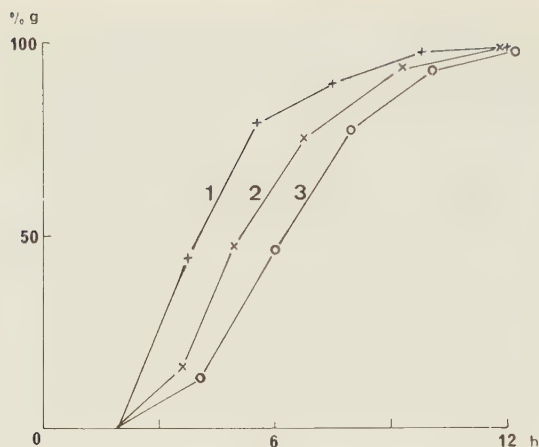


Fig. 5:

Cinétique de germination dans différents milieux. 1: moût 20%, tampon glycine-HCl 50 mM, pH 3.5; 2: milieu synthétique (cf tableau 1); 3: acide tartrique 50 mM + NaOH ad pH 4.0.

En éliminant successivement les substances dont l'absence ne diminue pas l'activité sur la germination, nous avons déterminé celle qui, à elle seule, induit la germination: c'est l'acide L(+)tartrique.

La cinétique de germination, dans une solution 50 mM d'acide L(+)tartrique ramenée à pH 3.5 par NaOH (fig. 5) se rapproche beaucoup de celle obtenue dans le milieu synthétique complet.

L'acide L(+)tartrique est un des composants majeurs des raisins. Il est en outre hautement spécifique de la vigne, car on ne le rencontre que chez de rares autres groupes de végétaux (*Pelargonium*, par ex.).

Il est donc vraisemblable que cet acide est le principal responsable, dans les raisins, de l'activation des spores de *C. diplodiella*.

Le mélange acide tartrique-tartrate de sodium possède un excellent effet tampon entre les pH 2,3 et 5. Nous choisirons donc, comme milieu synthétique minimum de germination, une solution de tampon tartrate, dont il reste à définir la concentration et le pH.

3.1 Concentration en tartrate

La teneur en acide tartrique des baies de raisins est d'environ 6–12 g/l, soit 40–80 mM, suivant l'état de maturation (Benvegnin et al., 1947). Une concentration aussi élevée est-elle nécessaire à la germination des spores de *C. diplodiella*, ou l'acide tartrique agit-il comme inducteur, à très faible concentration?

Milieu de germination: acide L(+)tartrique x mM + tampon citrate 50 mM, pH 4.0. Nous utilisons un tampon, pour maintenir le pH constant quelle que soit la concentration de tartrate; le tampon citrate a été choisi ici, car l'acide citrique n'est pas activateur, et sa composition élémentaire est plus simple que celle de la glycine.

Méthode de germination: goutte pendante, en chambre humide. Concentration des spores: 8.10^5 /ml.

Résultats: fig. 6.

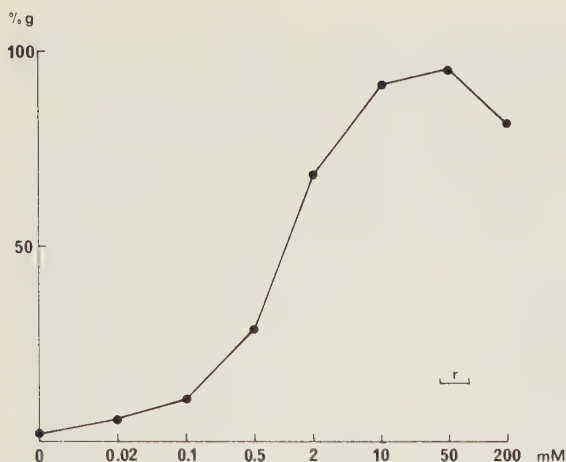


Fig. 6:

Germination en fonction de la concentration en tartrate dans une suspension de 8.10^5 spores/ml. % de germination en 24 heures. r: domaine de concentration de l'acide tartrique dans les baies de raisin.

La germination n'est bonne qu'au dessus de 2 mM d'acide tartrique. Elle est optimale à 50 mM. Une concentration de 200 mM est légèrement inhibitrice de la germination, mais la croissance du tube germinatif est fortement ralentie.

L'optimum observé correspond donc à la teneur en acide tartrique du milieu naturel. Mais une concentration 20 fois plus faible suffit à provoquer une bonne germination.

3.2 pH du milieu minimum

Les valeurs cardinales de pH pour la germination dans le tartrate (acide L(+)tartrique 50 mM, pH ramené aux valeurs désirées par NaOH) sont comparables à celles obtenues dans le moût. La germination est très bonne dans tout l'intervalle de pH 2,2 à 5,0. La vitesse maximum est atteinte ici entre pH 3,4 et 4,7. Le % de germination en 24 heures est maximum entre pH 2,7 et 5,0.

* * *

D'après ces résultats, nous pouvons établir comme suit la composition du milieu minimum de germination:

Acide tartrique 50 mM
NaOH ad pH 3,4–4,7.

3.3 Spécificité

L'acide L(+)tartrique est-il le seul à provoquer la germination des spores de *C. diplodiella*?

Nous avons essayé un certain nombre d'autres substances, soit de structure voisine de celle de l'acide tartrique, soit des métabolites éventuels de cet acide.

Milieu de germination: substance essayée 10 mM, tampon glycine-HCl 50 mM, pH 3.5.

Technique de germination: goutte pendante, en chambre humide.

Résultats: tableau 2.

Tableau 2 :

Pour-cent de germination en présence de
différents acides organiques

	% germination en 24 h
Acide L(+)tartrique	95
Acide D(+)malique	78
Acide DL-malique	80
Acide meso-tartrique	49
D-glucose	20
Acide D(-)tartrique	1
Acide L(-)malique	0
Acide citrique	4
Acide α -cétooglutarique	0
Acide succinique	2
Acide fumarique	2
Acide oxaloacétique	3
Acide glyoxylique	0
Acide tartronique	0
Acide DL glycérique	9
Acide 2-phosphoglycérique	1
Acide 3-phosphoglycérique	2
Acide dihydroxyfumarique	1
Acide DL-lactique	4
Acide acétique	2
Acide pyruvique	4
Acide oxalique	4
Acide glycollique	5
Acide L-aspartique	2
Acide D-aspartique	3
L asparagine	3
D asparagine	3
Acide L-glutamique	3
Acide D-glutamique	2
L-glutamine	5
D-glutamine	3
Acide L-mandélique	3
Acide D-mandélique	3
Acide ascorbique	0

Les acides L(+)tartrique, D(+)malique, DL malique et meso-tartrique, provoquent une bonne germination des spores de *C. diplodiella*. Toutefois, dans les acides D(+)malique et mésotartrique, le tube germinatif formé reste très court, le plus souvent à l'état d'ampoule germinative (planche II, 1, 2, et 4).

Le glucose possède un médiocre pouvoir activateur, tandis qu'aucune des autres substances essayées ne provoque la germination, en particulier les acides D(-)tartrique et L(-)malique (planche II, 3 et 5). Un seul des deux stéréoisomères des acides tartrique et malique agit donc sur les spores de *C. diplodiella*.

Dans le jus de raisin, on trouve, à une concentration relativement élevée, les acides L(+)tartrique et L(-)malique. Ce dernier est l'isomère naturel, qui ne provoque pas la germination des spores de *C. diplodiella*. Les acides meso-tartrique



Planche II:

Germination des spores de *C. diplodiella*, après 24 h à 27°C, en présence de:

1: acide L(+)-tartrique. 2: acide mesotartrique. 3: acide D(-)-tartrique.

4: acide D(+)-malique. 5: acide L(-)-malique. 6: acide L(+)-tartrique + acide D(+)-malique.

et D(+)-malique sont des isomères de synthèse. Le promoteur principal de la germination des spores de *C. diplodiella* est donc l'acide L(+)-tartrique. Les acides D(+)-malique et meso-tartrique n'existent pas dans le milieu naturel, mais sont également activateurs.

Le médiocre développement du tube germinatif en présence de ces derniers serait-il dû à une inhibition de la croissance par ces acides, ou au défaut de substrat carboné métabolisable dans le milieu? Les quelques essais suivants vont nous permettre d'y répondre.

Germination: en double couche; les milieux sont ramenés à pH 4,5 par NaOH, puis gélosés à 1,4%; on mesure le % de germination en 24 h à 27°C.

Milieux et résultats:

- 1) L(+)tartrate 50 mM : 96% (planche II, 1)
- 2) D(+)malate 50 mM : 72% (planche II, 4)
- 3) L(+)tartrate 50 mM + D(+)malate 50 mM : 85% (planche II, 6)

Même en présence de L(+)tartrate, la croissance du tube germinatif est inhibée par le D(+)malate. Ceci ne doit pas nous surprendre. Cet acide a été souvent reconnu comme un inhibiteur de certains enzymes du cycle de Krebs, notamment de la L-malate-déshydrogénase.

4. Autres traitements

D'autres traitements: thermiques (4°C pendant 24 h et 2 mois, -10°C pendant 24 heures, 42°C et 46°C pendant 15 et 60 min, 50°C pendant 5 et 15 min) et chimiques (furfuraldéhyde 0,2, 1 et 5 mM pendant 10 min; phényl-éthyl-alcool 1, 5 et 20 mM pendant 6 h) ont été essayés. Aucun n'a eu d'effet activateur sur les spores de *C. diplodiella*.

5. Facteurs internes de la germination

Indépendamment des conditions extérieures de germination (température, pH, substance activatrice), certains facteurs internes, propres aux spores ou au champignon, peuvent modifier ses caractéristiques de germination.

La maturité des spores, que nous étudierons dans un travail ultérieur, est l'un de ces facteurs. Nous verrons ici l'effet d'une concentration élevée de spores, puis l'influence de la composition du milieu de croissance du champignon sur les caractéristiques de germination.

5.1 Influence de la concentration des spores

Dans les pycnides, les spores ne germent pas. Il en est de même des spores sorties des pycnides et groupées autour de celles-ci à la surface du milieu de culture. Un phénomène d'autoinhibition se manifeste-t-il lorsque la concentration des spores est élevée?

Nous allons tout d'abord étudier la germination en fonction de la concentration des spores.

Méthode de germination: goutte pendante, en chambre humide.

Milieux de germination: a) acide tartrique 50 mM, acide citrique 50 mM, NaOH ad pH 4.0.
b) acide tartrique 1 mM, acide citrique 50 mM, NaOH ad pH 4.0.

Mesure de la concentration des spores: 3 comptages, au moyen d'un hémacytomètre de Thoma, dans un volume de $0,1\text{ mm}^3$ de la suspension la plus concentrée. Les suspensions moins denses sont obtenues par dilution de 5 fois en 5 fois de la suspension initiale.

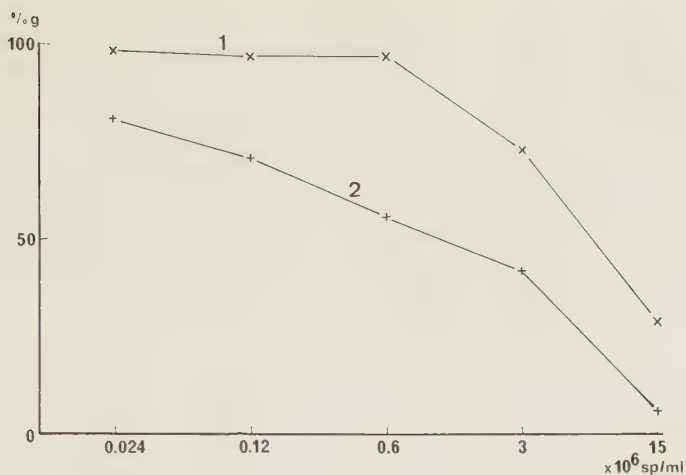


Fig. 7:

Effet de la densité de la suspension de spores sur la germination. % en 24 h à 27° C, en fonction du nombre de spores par ml de suspension. 1: dans 50 mM d'acide tartrique + 50 mM d'acide citrique, NaOH ad pH 4.0. 2: dans 1 mM d'acide tartrique + 50 mM d'acide citrique, NaOH ad pH 4.0.

Résultats: fig. 7. Jusqu'à $6 \cdot 10^5$ spores/ml, dans le tartrate 50 mM, la concentration de spores n'a pas d'effet sur la germination. Il n'en est pas de même dans le tartrate 1 mM, où le % de germination en 24 h dépend de la concentration des spores, même lorsque celle-ci est faible.

Plusieurs phénomènes peuvent expliquer une variation de la germination en fonction de la densité de la suspension de spores:

1) *Compétition* pour l'acide tartrique. La quantité d'acide disponible par spore est inversement proportionnelle à la quantité de spores présentes.

2) *Autoinhibition*: émission par les spores d'une substance inhibant leur germination, dont la concentration est fonction de la densité de la suspension.

3) *Modification de la composition de la phase gazeuse* dans la chambre humide, à la suite de l'activité métabolique des spores en atmosphère confinée. L'expérience suivante nous montrera si une telle modification a une influence sur la germination.

Technique de germination: goutte pendante, en chambre humide. Au fond de celle-ci, on dépose trois gouttes d'une suspension de $5 \cdot 10^7$ spores/ml dans du tampon acide tartrique-NaOH 50 mM à pH 4.0. La goutte pendante contient $5 \cdot 10^5$ spores/ml dans le même milieu.

Résultats:	% germination en 24 h
avec 3 gouttes de suspension concentrée	93
sans 3 gouttes de suspension concentrée	93

Il n'y a donc aucune différence, et on peut écarter l'hypothèse de l'effet d'une modification de la phase gazeuse.

Revenons à l'expérience précédente. La fig. 8 exprime les mêmes résultats, mais en fonction de la quantité de tartrate disponible par spore (rapport $\frac{\text{concentration tartrate}}{\text{concentration de spores}}$) exprimée en pMoles/spore (1 pMole = 10^{-12} Moles).

En admettant la seule hypothèse de la compétition, les deux courbes, à 1 mM et 50 mM, devraient théoriquement se confondre dans ce graphique. En fait, pour une quantité de tartrate disponible de 8,33 pMoles/spore, par exemple, la proportion de spores germées à une concentration de $1,2 \cdot 10^7$ spores/ml est nettement plus faible que pour une quantité de tartrate disponible inférieure (1,66 pMole/spore) à une concentration de $6,0 \cdot 10^5$ spores/ml (resp. 29% et 56%).

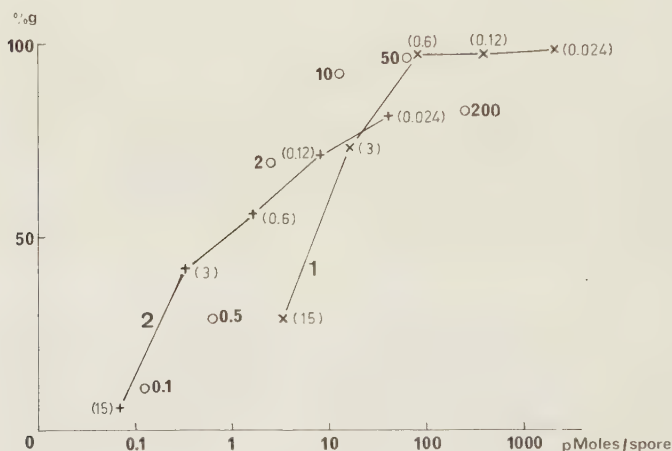


Fig. 8:

Effet de la quantité d'acide tartrique à disposition de chaque spore sur la germination. 1(x): dans 50 mM d'acide citrique + 50 mM d'acide citrique; NaOH ad pH 4.0. 2(+): dans 1 mM d'acide citrique + 50 mM d'acide citrique, NaOH ad pH 4.0 (la valeur entre parenthèses indique le nombre de spores ($\times 10^6$ par ml). o: résultats de l'expérience représentée également à la fig. 6 p. 237; la densité de spores est constante ($0,8 \times 10^6$ sp/ml), le nombre en gras à côté du cercle indique la concentration d'acide tartrique dans le milieu.

Nous avons également reporté sur ce graphique les résultats de l'expérience (p. 236 et fig. 6) de germination en fonction de la concentration en tartrate.

De l'ensemble de ces résultats, il apparaît que, pour assurer une bonne germination, une quantité de 10–100 pMoles d'acide tartrique par spore est nécessaire.

Dans des suspensions diluées (au-dessous de $6 \cdot 10^5$ spores/ml), la concentration des spores n'abaisse le % de germination qu'en présence d'une faible concentration en acide tartrique (1 mM par exemple): compétition.

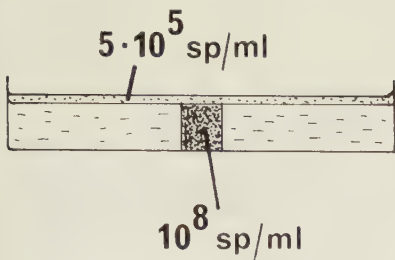


Fig. 9:

Technique de germination pour l'étude de l'autoinhibition. Méthode du „cylindre de spores“.

Au-dessus de $6 \cdot 10^5$ spores/ml, l'effet de la concentration en spores se manifeste quelle que soit la concentration d'acide tartrique: autoinhibition, en plus de la compétition.

En conclusion, les deux phénomènes (compétition et autoinhibition) régissent la diminution de la germination en fonction de la concentration des spores.

5.2 L'autoinhibition

Les spores semblent donc diffuser un „principe“ autoinhibiteur actif dans une suspension dense. Les expériences suivantes nous permettront de préciser son effet.

Méthode du „cylindre de spores“: dans une boîte de Petri de 45 mm, on coule 8 ml de tampon acide tartrique — NaOH 50 mM, pH 4.5, gélifié à 1,4%. On perce dans ce milieu solidifié un trou cylindrique (fig. 9) de 5 mm de diamètre, que l'on remplit d'une suspension de 10^8 spores/ml dans le même milieu. Après solidification, on coule par dessus 1 ml d'une suspension de $5 \cdot 10^5$ spores/ml dans NaCl 50 mM gélifié à 1%, qu'on étale uniformément. On mesure, après 24 heures à 27° C, le % de germination des spores de la couche supérieure en fonction de la distance au bord du „cylindre de spores“.

Résultats: fig. 10. L'inhibition, nette au voisinage immédiat de la suspension concentrée, diminue rapidement avec la distance. A 1 mm, il y a encore une légère diminution du % de germination, et plus aucune action au delà. Il semble donc que l'inhibiteur diffuse très peu dans l'agar.

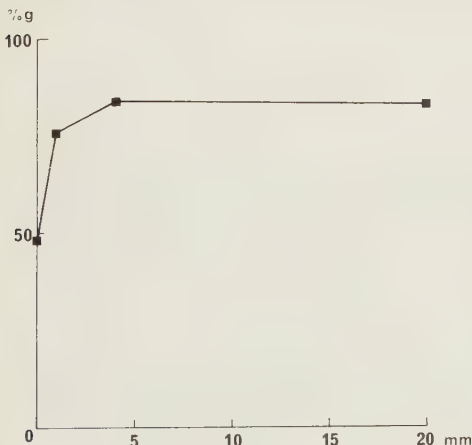


Fig. 10:

Mise en évidence de l'autoinhibition par une suspension dense de spores. Méthode du „cylindre de spores“, % de germination en 24 heures, à 27° C, en fonction de la distance au bord du cylindre.

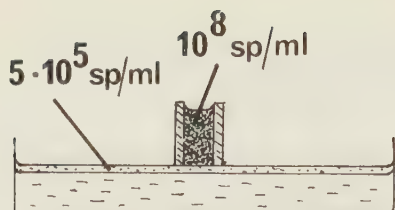


Fig. 11:

Technique de germination pour l'étude de l'autoinhibition. Méthode du tube de Heatley.

Méthode du tube de Heatley: représentée à la fig. 11. Couche inférieure: 8 ml de tampon acide tartrique-NaOH, pH 4,5, gélosé à 1,4%. Couche supérieure: 1 ml d'une suspension de $5 \cdot 10^5$ spores/ml dans NaCl 50 mM, gélosé à 1%. On dépose sur ce milieu un cylindre de verre de 5 mm de diamètre intérieur et 10 mm de haut (tube de Heatley) qu'on remplit d'une suspension dense de spores (10^8 spores/ml) dans NaCl 50 mM. Incubation: 24 h à 27° C. Lecture des résultats: on enlève le cylindre, on lave délicatement la surface de l'agar, et on dépose une lamelle à l'endroit où était posé le cylindre. On mesure le % de germination des spores de la couche supérieure, à l'endroit où celle-ci était en contact avec la suspension dense. Un témoin sans cette dernière est mis à germer parallèlement.

Résultats:	% germination en 24 h
Germination sous la suspension dense	32
Témoin	95

En interposant, dans la même expérience, une membrane filtrante (Millipore GSWP 0,22 μ) entre le cylindre et l'agar, on obtient les résultats suivants:

	% germination en 24 h
Germination sous la suspension dense	50
Témoin	95

La substance autoinhibitrice est capable de traverser la membrane filtrante, mais ce mince obstacle suffit à en diminuer sensiblement les effets.

Mise en évidence de l'autoinhibition après diffusion du principe responsable dans l'agar (fig. 12): dans un tube de 8 mm de diamètre, on introduit 0.5 ml de l'un des milieux gélosés:

- A: acide tartrique-NaOH 50 mM pH 4,5, agar 1,4%
 B: NaCl 50 mM, agar 1,4%

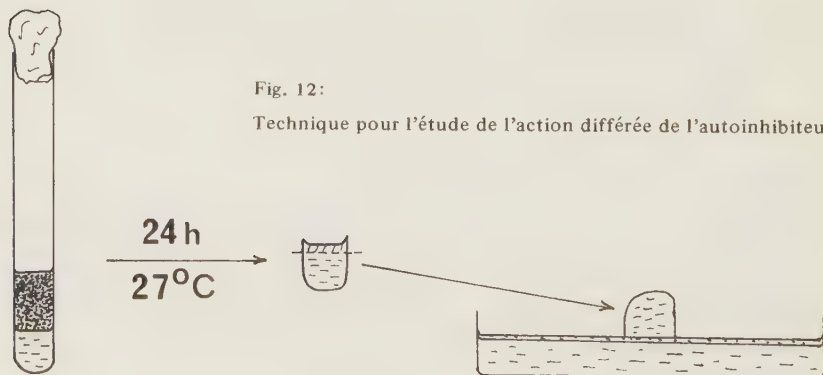


Fig. 12:

Technique pour l'étude de l'action différée de l'autoinhibiteur.

Après solidification de la gélose, on verse par dessus 1 ml d'une suspension de 10^6 spores/ml dans:

sur milieu A: acide tartrique – NaOH 50 mM pH 4.5
sur milieu B: NaCl 50 mM

On met à incuber à 27°C pendant 24 heures. On vide alors la suspension de spores, on casse le tube, on coupe le bloc d'agar de façon à avoir une surface plane, et on le dépose sur un milieu de germination double couche; couche inférieure: 8 ml ac. tartrique – NaOH 50 mM pH 4,5, gélifié à 1,4%; couche supérieure: 1 ml NaCl 50 mM gélifié à 1%, avec 5.10^5 spores/ml. Lecture des résultats: mesure du % de germination en 24 heures à l'emplacement du bloc d'agar. Un témoin sans bloc d'agar est mis à germer parallèlement.

Résultats:	% germination en 24 h
Témoin	90
Bloc d'agar = milieu A (tartrate)	70
Bloc d'agar = milieu B (NaCl)	56

Conclusion: la substance inhibitrice est produite aussi bien (sinon mieux) par les spores au repos que par les spores dans un milieu activateur. Est-elle produite aussi par le champignon dans le milieu de culture?

Sur milieu F-T (12 ml coulés en boîte de Petri de 9 cm), on place un filtre Millipore GSWP (0,22 μ) et on dépose sur le filtre un inoculum de *C. diplodiella*. On met en incubation à 27°C pendant 10 jours. On enlève alors le filtre portant la culture et on découpe dans l'agar sous-jacent des disques de 1 cm de diamètre. On prépare des milieux de germination en double couche, avec milieu minimum gélifié dans la couche inférieure, et 5.10^5 spores/ml dans NaCl 50 mM gélifié à 1% dans la couche supérieure; on dépose les disques au centre de ces milieux. Incubation: 24 heures à 27°C. Témoins: germination en double couche, sans disque de milieu de culture.

Résultats:	% germination en 24 h
sous le disque de milieu de culture	93
sans le disque de milieu de culture	92

On n'observe pas, dans ces conditions, d'inhibition par le milieu de culture. Il semble donc que seules les spores diffusent une substance inhibitrice de la germination.

5.3 Effet de la présence d'acide tartrique dans le milieu de croissance sur la germination

C. diplodiella pousse et fructifie normalement sur le milieu F-T sans acide L(+)tartrique. Toutefois, les spores produites par une telle culture germent moins bien dans le milieu minimum que celles provenant d'une culture sur le milieu F-T complet (contenant 150 mg/l d'acide tartrique), ainsi qu'il apparaît dans l'expérience suivante:

On établit la cinétique de germination, dans le milieu minimum, de spores de *C. diplodiella* provenant, d'une part de cultures sur milieu F-T complet, d'autre part de cultures sur le même milieu sans acide tartrique.

Technique de germination: agar „double couche“, 5.10^5 spores/ml dans la couche supérieure.

Milieu de germination: acide tartrique – NaOH 50 mM, pH 4.5, gélifié à 1,4%.

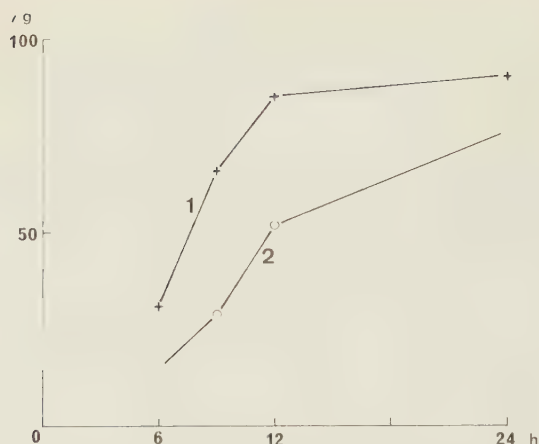


Fig. 13:

Cinétique de germination, dans le milieu minimum, à 27° C, de spores provenant de cultures sur milieu F-T complet (1) et sur le même milieu sans acide tartrique (2).

Résultats: fig. 13. La germination est plus lente chez les spores provenant de cultures sur milieu dépourvu d'acide tartrique, et elle est moins complète.

L'expérience suivante nous permettra d'évaluer la concentration minimum en acide tartrique dans le milieu de culture, nécessaire pour assurer une bonne germination des spores qui s'y sont formées.

On cultive *C. diploidiella* sur des milieux F-T avec différentes concentrations d'acide L(+)tartrique. Après plus de 30 jours de culture, on mesure le % de germination, en 24 heures, des spores provenant de chacun des milieux, dans le milieu minimum de germination, et dans un tampon non activateur.

Milieux de germination: a) acide tartrique — NaOH 50 mM pH 4.5, agar 1,4%

b) acide citrique — NaOH 50 mM pH 4.5, agar 1,4%

Technique de germination: agar double couche, $5 \cdot 10^5$ spores/ml dans la couche supérieure.

Résultats: fig. 14. 0.1 mM d'acide tartrique dans le milieu de culture suffisent donc à assurer ensuite une bonne germination dans le milieu minimum. Cette concentration est insuffisante pour la germination des spores (fig. 6, p. 237).

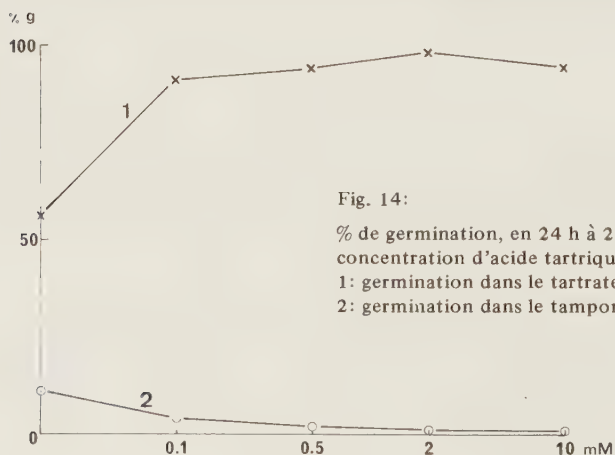


Fig. 14:

% de germination, en 24 h à 27° C, en fonction de la concentration d'acide tartrique dans le milieu de croissance.
1: germination dans le tartrate 50 mM pH 4.5;
2: germination dans le tampon citrate 50 mM pH 4.5.

Discussion

Adaptation du champignon au parasitisme

L'étude écophysiological des pycnidiospores de *C. diplodiella* nous montre à quel point, et par quels moyens, le champignon est adapté au parasitisme.

La période pendant laquelle il peut se développer végétativement est limitée à l'époque de la maturation des raisins, soit en général de juillet à fin septembre. Durant les neuf mois restants, le champignon se maintient dans le sol sous forme de spores qui doivent conserver leur pouvoir germinatif.

En outre, l'infection n'a lieu en général qu'après une chute de grêle, ce qui ne se produit pas toujours chaque année au même endroit. Aussi, les spores doivent-elles être capables de survivre dans le sol plusieurs années de suite.

Le champignon est incapable de percer la cuticule des raisins, ou de pénétrer par des orifices naturels. Seule une blessure lui permet d'entrer en contact avec les tissus internes de l'hôte. Ici, le degré d'adaptation parasitaire est faible. *C. diplodiella* est un parasite de blessures, au sens de Gäumann (1946).

Une fois en contact avec la pulpe, la germination doit s'effectuer rapidement, avant que la cicatrisation ne dresse une nouvelle barrière contre l'infection.

Comment le champignon répond-t-il à ces exigences écologiques?

Tout d'abord, les spores sont dormantes et ne peuvent pas, en général, germer dans le sol. Elles gardent longtemps leur vitalité (Terrier, 1949) et ne peuvent être activées ni par un séjour à basse température, ni par un choc thermique. Les froids hivernaux, pas plus que les chaleurs estivales, ne lèveront de ce fait leur dormance. Dans le sol, deux facteurs au moins empêchent la germination: l'absence de l'agent activateur spécifique (L(+)-tartrate) et le pH généralement trop élevé.

D'autre part, les exigences du champignon pour sa germination correspondent bien au milieu offert par la pulpe des raisins qui est à la fois activateur et substrat pour le développement:

<i>Milieu naturel</i> (pulpe des raisins)	<i>C. diplodiella</i> (conditions de germination <i>in vitro</i>)
pH: 2,2–3,4	optimum à pH 2,2–4,9
température estivale	13°C min. 27°C opt. 37°C max.
p. osmotique: 12–25 atm.	p. osmotique max. tolérable: 25 atm.
conc. élevée d'acide	ac. L(+)-tartrique nécessaire à l'activation,
L(+)-tartrique: 40–80 mM	concentration optimale: 50 mM

Nous avons vu que la présence d'acide tartrique dans le milieu de croissance était nécessaire pour assurer une bonne germinabilité des spores. Dans les conditions naturelles, le champignon ne se développe que sur des raisins, et les spores sont formées sur un substrat contenant cet acide. Expérimentalement, toutefois, une concentration 500 fois plus faible (0,1 mM) suffit.

Si les propriétés de résistance, de dormance, les valeurs cardinales de pH, température et pression osmotique observées ici sont en accord avec les conditions naturelles, elles peuvent aussi bien se rencontrer chez des espèces non parasites, et ne sont pas le reflet d'une adaptation très poussée.

Par contre, l'action spécifique de l'acide tartrique sur l'activation montre une adaptation étroite du parasite à son hôte. De cette propriété résultent des avantages sélectifs évidents: la dormance est maintenue aussi longtemps que la spore n'est pas en contact avec un milieu contenant cet acide; dans la nature, cette condition n'est remplie qu'au niveau des blessures occasionnées aux grains de raisin. Ainsi, la longue survie à l'état dormant, associée au maintien de cet état hors du milieu naturel, permet la conservation des spores du champignon dans une région, par exemple, où les chutes de grêle sont très sporadiques.

C. diplodiella est-il un parasite obligatoire ou facultatif? Il croît, *in vitro*, sur de nombreux milieux naturels et synthétiques. Dans la nature, on ne le rencontre à l'état végétatif que comme parasite de la vigne. Des champignons isolés du sol et de l'air hors des zones viticoles (Mathur et Thirumalachar, 1959; Mme J. Nicod, communication personnelle) et considérés comme des *C. diplodiella* par Petrak (1960) et Sutton (1969) ont en fait des caractères physiologiques bien différents. Ils sont incapables, entre autres, de se développer dans des raisins blessés expérimentalement.

Coniella diplodiella doit donc être considéré comme un parasite *obligatoire* dans les conditions naturelles, mais non lié nécessairement à des tissus vivants. Ses exigences pour la croissance et la sporulation sont assez limitées: une source de carbone organique (ex: glucose), des sels minéraux, de la thiamine, et de la biotine si la source d'azote n'est pas l'asparagine (Turian et Staehelin, 1954; Turian, 1954a). C'est donc lors de la germination, et peut être aussi par la faculté d'envahir les tissus de l'hôte, que se manifeste le mieux le caractère parasitaire du champignon. Nous sommes tenté de considérer *C. diplodiella* comme un parasite jeune, c'est-à-dire peu différencié par rapport à d'hypothétiques ancêtres saprophytes.

Résumé

Les pycnidiospores de *C. diplodiella* germent bien dans le moût de raisin à pH 3.5. Elles ne germent pas dans l'eau distillée, ni dans les tampons usuels à pH 3.5. La germination est optimale entre pH 2,2 et 4,9, à 27°C et pour une pression osmotique inférieure à 25 atm. L'oxygène est nécessaire à la germination, contrairement à l'anhydride carbonique.

La substance responsable de l'activation des spores dans le moût est l'acide L(+)tartrique. Deux autres acides de structure voisine (D(+))malique et meso-tartrique) provoquent également la germination. Ils bloquent toutefois la croissance apicale du tube germinatif.

La germination est inhibée par une concentration élevée de spores. L'auto-inhibition et la compétition pour l'acide tartrique concourent à cet effet. Le champignon pousse et fructifie bien en absence d'acide tartrique, mais les spores produites dans ces conditions germent mal.

Zusammenfassung

Pyknosporen von *C. diplodiella* keimen gut in Traubenmost bei pH 3,5, dagegen nicht in destilliertem Wasser oder in den gewöhnlichen Puffern bei pH 3,5. Die Keimung ist optimal zwischen pH 2,2 und 4,9, bei einer Temperatur von 27°C und einem osmotischen Druck von weniger als 25 atm. Sauerstoff ist für die Keimung unerlässlich, Kohlendioxyd aber nicht.

L(+)Weinsäure ist für die Keimstimulation verantwortlich. Zwei andere Säuren mit ähnlicher Struktur (D(+)Apfelsäure und meso-Weinsäure) können auch die Keimung einleiten, hindern aber das weitere Wachstum des Keimschlauchs.

Die Keimung wird durch eine hohe Sporendichte gehemmt; diese Unterdrückung rührt von der Selbsthemmung und von der Konkurrenz der Sporen für Weinsäure her. Der Pilz ist im Stande, sich in Abwesenheit von Weinsäure gut zu entwickeln und Fruchtkörper zu bilden, aber die in diesen Fruchtkörpern erzeugten Sporen keimen schlecht.

Summary

Pycnidiospores of *C. diplodiella* germinate well in grape juice at pH 3,5. They fail to germinate, neither in distilled water, nor in usual buffers of pH 3,5. Optimal conditions for germination are: pH between 2,2 and 4,9; temperature 27°C; osmotic pressure lower than 25 atm. Oxygen is necessary for germination, carbon dioxide is not.

The substance responsible for activation of the spores in grape juice is L(+)tartaric acid. Two other acids, resembling in structure (D(+)malic and meso-tartaric) lead to germination, although they inhibit apical growth of the germ tube.

Germination is reduced by a high concentration of spores. Self-inhibition and competition for tartaric acid contribute to this inhibition. Although the fungus grows and fructifies well without tartaric acid, spores produced under these conditions germinate poorly.

M. le professeur Ch. Terrier nous a accueilli dans son laboratoire, et a toujours su nous conseiller judicieusement, tout en nous laissant une grande liberté d'action. Nous lui exprimons notre profonde gratitude.

Notre reconnaissance va également à M. le professeur G. Turian, de Genève, pour l'intérêt constant qu'il a manifesté à l'égard de notre travail, et pour ses précieux conseils et encouragements.

M. le professeur P.A. Siegenthaler nous a reçu dans son laboratoire et nous a fait bénéficier de son expérience en physiologie cellulaire. Nous tenons à l'en remercier ici.

Bibliographie

- Benvegnin L., E. Capt et E. Piguët 1947. Traité de vinification. Payot, Lausanne. 575 pp.
- Bolay A. 1963. Le coïtre de la vigne. Agr. romande II(6), sér. A, 60–62.
- et R. Corbaz, 1961. Nouvelles recherches dans le domaine de la lutte contre le coïtre de la vigne (*Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.). Ann. Agr. Suisse 62, 239–248.
- et J.-L. Simon, 1964. La lutte contre le coïtre de la vigne. Agr. romande III (7–8) sér. A, 68–71.
- Brewer J.H. et D.L. Allgeier, 1966. Safe Self-contained Carbon Dioxide – Hydrogen Anaerobic System. Appl. Microbiol. 14, 985–988.
- Dobbs C.G. et W.H. Hinson, 1953. A Widespread Fungistasis in Soils. Nature 172, 197–199.
- Dufour J. 1888. Notice sur quelques maladies de la vigne: le black-rot, le coïtre et le mildiou des grappes. Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat. 23, 97–113.
- Faes H. et M. Staehelin, 1922. Le coïtre de la vigne (*Coniothyrium diplodiella*) ou maladie de la grêle. Ann. Agr. Suisse 1922.
- et – 1923a. Nouvelle contribution à l'étude du coïtre de la vigne (*Coniothyrium diplodiella*) ou maladie de la grêle. Ann. Agr. Suisse 1923.
- et – 1923b. Troisième contribution à l'étude du coïtre de la vigne (*Coniothyrium diplodiella*) ou maladie de la grêle. Ann. Agr. Suisse 1923.
- et – 1935. Le coïtre de la vigne (*Coniothyrium diplodiella*). Progr. Agric. et Vitic. 56, 108, 134, 158, 187, 258, 281.
- Gäumann E. 1946. Pflanzliche Infektionslehre. Birkhäuser, Bâle. 611 pp.
- Goddard D.R. 1935. The reversible heat activation inducing germination and increased respiration in the ascospores of *Neurospora tetrasperma*. J. Gen. Physiol. 19, 45–60.
- Istvanffi G. 1902. Etudes sur le rot livide de la vigne (*Coniothyrium diplodiella*). Ann. Inst. Centr. Ampél. Hongr. 2, Pallas, Budapest. 288 pp.
- Kliwer W.M. 1966. Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*. Plant Physiol. 41, 923–931.
- Lin C.K. 1940. Cornell Univ. Agr. Exp. Stn Mem. 233, 3–33.
- Locci R. et S. Quaroni, 1972. Studies on *Coniothyrium diplodiella*. I. Isolation, cultivation and identification of the fungus. Riv. Patol. Veg. Ser. IV, 8, 59–82.
- Mathur P.N. et M.J. Thirumalachar, 1959. Studies on some Indian soil fungi. I. Some new or noteworthy Sphaeropsidales. Sydowia 13, 143–147.
- Petrak F. 1960. Ergebnisse einer Revision der Grundtypen verschiedener Gattungen der Ascomyceten und *Fungi imperfecti*. Sydowia 14, 347–354.
- et H. Sydow, 1926. Die Gattungen der Pyrenomyceten, Sphaeropsiden und Melanconieen. I. Die phaeosporen Sphaeropsiden und die Gattung *Macrophoma*. Rep. Sp. Nov. Reg. Veg. 42 (1) 551 pp.
- Reymondin, 1798. L'art du vigneron, pour servir de direction aux propriétaires de vignes. Lausanne.
- Saccardo P.A. 1884. *Coniothyrium diplodiella*. Sylloge Fungorum 3, 310.
- Spezzazzini C. 1878. Ampelomiceti Italici, ossia enumerazione, diagnosi e storia dei principali parassiti della vite. Riv. Vitic. Enol. Ital. ser. II, 2, 339–342.
- Staehelin M., H. Aebi et A. Bolay, 1956. Essais de lutte contre le coïtre de la vigne (*Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.). Ann. Agr. Suisse 57, 555–560.
- Sussman A.S., J.R. Distler et J.S. Krakow, 1956. Metabolic aspects of *Neurospora* activation and germination. Plant Physiol. 31, 126–135.
- et H.O. Halvorson, 1966. Spores: Their Dormancy and Germination. Harper, NY. 354 pp.
- Sutton B.C. 1969. Type studies of *Coniella*, *Anthasthoopta* and *Cyclodomella*. Can. J. Bot. 47, 603.
- Terrier Ch. 1949. Le problème que pose la lutte contre le coïtre. Rev. Romande Agric. Vitic. Arboric. 5, 89–91.
- Turian G. 1954a. „Effet d'épargne“ de l'asparagine vis-à-vis de la biotine chez *Coniella diplodiella*. Phytopath. Z. 19, 211–214.
- 1954b. Récents progrès dans la lutte contre le coïtre de la vigne. Rev. Romande Agric. Vitic. Arboric. 10, 12–14.

- et H. Leyvraz 1954. Une nouvelle arme chimique contre le coïtre de la vigne.
Rev. Romande Agric. Vitic. Arboric. 10, 97—98.
- et Staehelin, 1954. Nouvelles recherches sur le champignon du coïtre de la vigne
(*Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.). Ann. Agr. Suisse 55, 987—997.
- et — 1955. Essais de lutte chimique contre les spores du champignon du coïtre de la
vigne dans le sol. Ann. Agr. Suisse 56, N.S. 4, 799—808.
- Viala P. 1893. Les maladies de la vigne. 3e éd. Masson, Paris et Coulet, Montpellier. 595 pp.
- et L. Ravaz 1888. Le Black Rot et *Coniothyrium diplodiella*. Les maladies de la vigne,
2e éd. p. 77.
- Yanagita T. 1957. Biochemical aspects on the germination of conidiospores of *Aspergillus*
niger. Arch. Mikrobiol. 26, 329—344.

Michel Aragno
Laboratoire de Cryptogamie
Institut de Botanique
11, rue E.-Argand
CH-2000 Neuchâtel 7

Etude de la germination
des pycnidiospores
de *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.,
agent du coître de la vigne.
II. Etude du processus de la germination.

par Michel Aragno

Laboratoire de Cryptogamie
Institut de Botanique de l'Université Neuchâtel

Manuscrit reçu le 12 novembre 1973

Introduction

Dans la première partie de ce travail (Aragno, 1973) nous avons montré que les spores de *C. diplodiella* ne germent bien qu'en présence d'acide L(+)tartrique; les acides D(+)malique et mesotartrique provoquent également la germination, mais inhibent la croissance apicale. Les conditions physicochimiques optimales de la germination *in vitro* correspondent bien à celles du milieu naturel, la pulpe des raisins en cours de maturation.

Nous tenterons ici, par une étude du processus de la germination, de mieux comprendre le mode d'action de l'acide tartrique.

Matériel et méthodes

Les souches, milieux et méthodes décrits dans le travail précédent (Aragno, 1973) sont repris ici. Toutefois, le milieu de germination devant être changé au cours de certaines expériences, nous avons usé d'une autre méthode, qui consiste à faire germer les spores sur membrane filtrante.

10 ml d'une suspension de spores dans une solution de NaCl 50 mM ($5 \cdot 10^4$ spores/ml environ) sont filtrés sur membrane Sartorius, type SM 11.302, porosité 2μ (selon Hagen-Poiseuille), diamètre 47 mm. Le filtre est ensuite placé sur le milieu, soit gélifié (8 ml par boîte de Petri

de 5 cm), soit liquide, imprégnant alors un tampon de cellulose. Pour changer de milieu, les filtres sont enlevés, placés sur le porte-filtre, lavés par passage de 50–100 ml d'une solution stérile 50 mM de NaCl, en aliquotes de 5–10 ml, et déposés enfin sur le nouveau milieu.

L'observation directe est malaisée, vu l'opacité du filtre. Celui-ci devient transparent lorsqu'il est plongé dans un milieu de même indice de réfraction (1,515). Aussi avons-nous procédé comme suit: on découpe, dans le filtre portant les spores, un carré de 1 cm de côté environ. On le colore 5 minutes par immersion dans une solution alcoolique de 0.5% de fuchsine basique, puis on le lave 3 fois à l'eau, on le déshydrate rapidement, on le place dans du toluène jusqu'à ce qu'il devienne complètement transparent, et on le monte au Caedax, entre lame et lamelle. Cette méthode a en outre l'avantage de conserver des témoins de chaque expérience.

Résultats

1. Cinétique de l'apparition du tube germinatif

Un des intérêts de l'étude de la germination des spores en général est qu'il s'agit souvent d'un phénomène assez bien synchronisé: idéalement, dans une population de cellules identiques, toutes dans le même état physiologique au départ (dormance), un traitement activateur a pour effet de déclencher, simultanément chez toutes les spores, une succession de phénomènes biochimiques transformant la cellule dormante en une cellule en état de vie active normale (activité métabolique, croissance). Théoriquement donc, si cette succession se faisait avec un synchronisme parfait dans toutes les spores, l'apparition de tous les tubes germinatifs devrait avoir lieu au même moment. En fait, ces conditions idéales ne sont jamais réalisées. La population des spores peut donc se répartir en fonction du temps nécessaire à l'apparition du tube germinatif, le graphe de cette répartition s'obtenant par dérivation de celui de la cinétique de germination.

En considérant la moyenne des résultats de plusieurs expériences, nous avons obtenu des courbes cinétiques moyennes de germination, à 27°C, dans le moût (20% dans le tampon glycine – HCl 50 mM pH 3,5 : 7 expériences) et dans le milieu minimum (tampon tartrate 50 mM, pH 4,0 : 5 expériences).

Technique de germination: goutte pendante, en chambre humide. Les résultats individuels ont été multipliés par le facteur:

$$\frac{100}{\% \text{ de germination en 24 h}}$$

de façon à ne pas tenir compte de la proportion, variable d'une expérience à l'autre, de spores n'ayant pas germé en 24 h, que nous assimilons à des spores non viables.

Résultats: fig. 1. La dérivation graphique des courbes obtenues nous donnerait la répartition en fonction du temps de germination. Cette répartition peut être ramenée à une distribution normale de type:

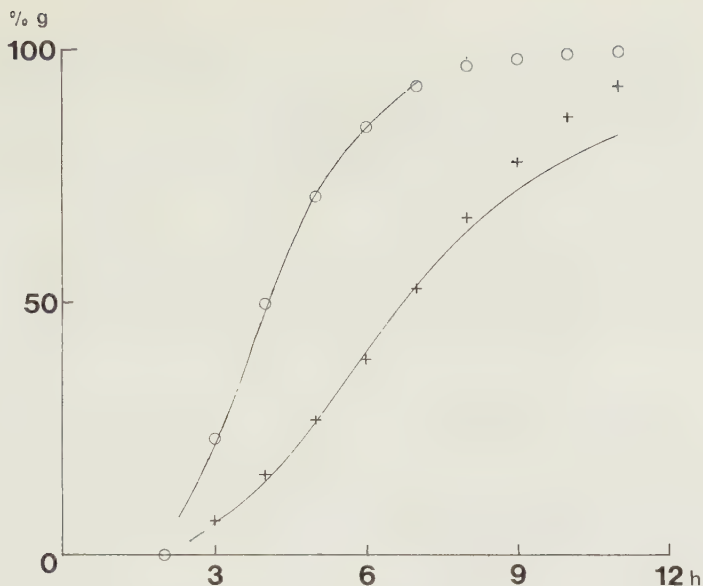


Fig. 1:

Cinétique de l'apparition du tube germinatif.

o: germination dans le moût 20%, tampon glycine-HCl
50 mM pH 3.5, moyenne de 7 expériences.

+ : germination dans le milieu minimum (ac. tartrique -
NaOH 50 mM, pH 4.0), moyenne de 5 expériences.

Les courbes en trait continu sont les graphes de la fonction (5)
appliquée aux valeurs expérimentales.

$$(1) \quad f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{\sigma^2}} \quad \text{pour } x > a$$

et $f(x) = 0$ pour $x \leq a$

où: x = temps après le début de l'activation

μ = temps après le début de l'activation où la fréquence
d'apparition des tubes germinatifs est maximale
($\neq$ temps moyen de germination).

σ = écart type de la distribution

a = temps nécessaire à l'apparition des premiers tubes
germinatifs.

La cinétique de germination s'exprimerait alors par l'intégrale:

$$(2) \quad \% \text{ germination} = 100 \int_a^x f(x) = 100 (F(x) - F(a))$$

Une autre relation pouvant s'exprimer sous forme linéaire permet en général une assez bonne représentation de la cinétique de germination.

$$\text{Soit } G = \frac{\text{nombre de spores germées}}{\text{nombre de spores non germées}}.$$

On constate en général (McCormick, 1964) que le log de G varie à peu près linéairement avec le log du temps, soit:

$$(3) \quad \ln G = k \ln x - h \quad \text{qu'on peut exprimer:}$$

$$(4) \quad G = e^{-h_x k}$$

où k et h sont des constantes caractérisant l'allure de la courbe.

On a alors:

$$(5) \quad g(\% \text{ de germination}) = 100 \frac{e^{-h_x k}}{1 + e^{-h_x k}}$$

Le temps après le début de l'activation où la fréquence d'apparition des tubes germinatifs est maximale (μ) s'obtient en posant: $g'' = 0$, d'où:

$$(6) \quad \mu = \sqrt{\frac{k-1}{k+1}} e^h$$

Soit m le temps moyen de germination. $G(m) = 1$, d'où:

$$(7) \quad \ln m = \frac{h}{k} \quad \text{soit } m = e^{\frac{h}{k}}$$

Une mesure de la dispersion nous est donnée par s = temps nécessaire pour passer de $G = 1$ à $G = e$:

$$(8) \quad s = m(e^{\frac{1}{k}} - 1)$$

En appliquant graphiquement nos résultats expérimentaux à la relation (3), nous obtenons les valeurs suivantes des paramètres:

a) Pour la cinétique de germination dans le moût:

$$k = 4,3 \text{ et } h = 5,9$$

$$\text{d'où nous tirons: } m = 3,95 \text{ et } s = 1,03$$

$$\text{Le graphe de la fonction } g = 100 \frac{e^{-4,3 \times 5,9}}{1 + e^{-4,3 \times 5,9}}$$

est représenté à la fig. 1 (trait continu).

b) Pour la cinétique de germination dans le tartrate:

$$k = 3,4 \text{ et } h = 6,4$$

$$\text{d'où nous tirons: } m = 6,55 \text{ et } s = 2,22$$

$$\text{Le graphe de la fonction } g = 100 \frac{e^{-3,4 \times 6,4}}{1 + e^{-3,4 \times 6,4}}$$

est représenté à la fig. 1 (trait continu).

2. L'activation

L'action de l'acide tartrique doit-elle s'étendre sur toute la durée de la germination, ou, au contraire, un traitement de plus courte durée suffit-il à assurer l'achèvement ultérieur du phénomène dans un milieu dépourvu de cet acide?

2.1 Cinétique de l'activation

Principe: On met des spores en présence d'acide tartrique pendant un temps t , puis on les place sur un milieu tamponné de mêmes pH et concentration, mais sans acide tartrique, pendant 24 h t . On exprimera le % de germination en fonction de t .

Méthode de germination: sur membrane filtrante

Milieux de germination:

(1) acide tartrique — NaOH 50 mM pH 4,5 + agar 1,4%

(2) acide citrique — NaOH 50 mM pH 4,5 + agar 1,4%

Résultats: fig. 2. Dans cette expérience, 13% des spores ont germé sans activation et, en 24 heures dans le milieu au tartrate, 93% des spores ont germé. En ne tenant compte, ni des spores aptes à germer dans le citrate sans activation, ni des spores ne germant pas dans le tartrate en 24 h (7%), nous obtenons la courbe -o-, représentant la cinétique de l'activation par le tartrate.

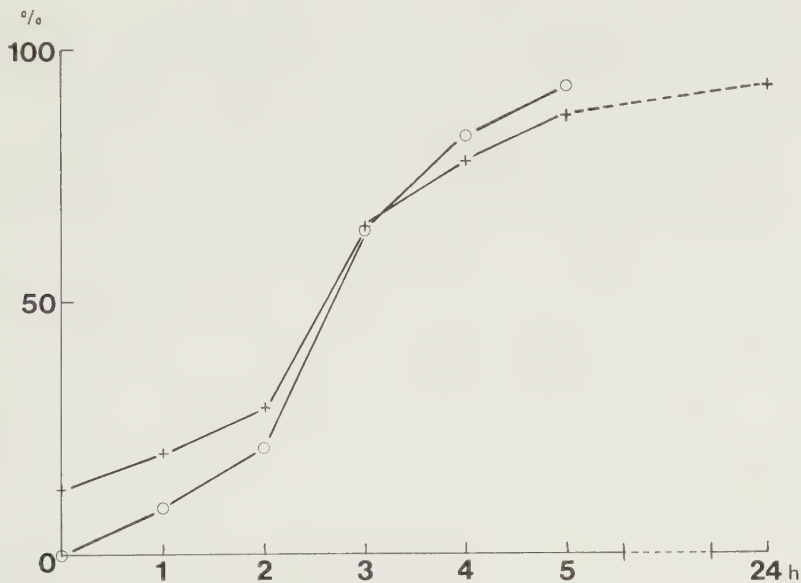


Fig. 2:

Cinétique de l'activation par l'acide tartrique.

+ - : % de germination en 24 heures au total, à 27° C, en fonction du temps d'activation dans l'acide tartrique.

- o - : % de spores activées par l'acide tartrique (24 h : 100%).

Le temps moyen d'activation (temps nécessaire à activer 50% des spores dormantes susceptibles de germer) est ici de 2,7 heures environ; il est bien inférieur au temps moyen de germination (6,7 heures, dans le même milieu).

Ce temps d'activation peut être considéré comme un „point de non retour“ à partir duquel les spores sont à même de poursuivre leur développement en absence de tartrate. Nous verrons toutefois plus loin (p. 61) qu'à ce stade, les spores peuvent être désactivées par un traitement chimique.

Nous pouvons donc distinguer deux phases dans le processus de germination:

- une phase d'activation, d'une durée moyenne, dans ces conditions, de 2,7 heures, où la présence d'acide tartrique est nécessaire à assurer la germination.
- une deuxième phase, où la germination se poursuit même en absence d'acide tartrique, que nous qualifierons, pour cette raison et d'autres que nous verrons par la suite, de phase *prévégétative*.

2.2 Activation et anaérobiose

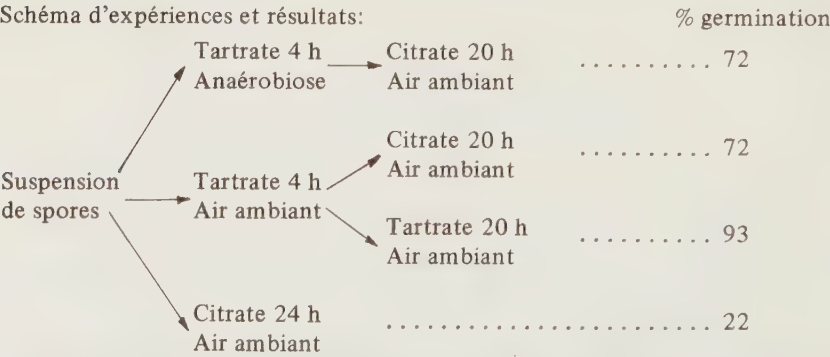
Nous avons montré (Aragno, 1973) que l'oxygène était nécessaire à l'achèvement de la germination. L'activation seule, comme chez *Mucor rouxii* et *M. hiemalis* (Sussman et Halvorson, 1966) ou chez les ascospores de *Neurospora* (Goddard, 1935) peut-elle se faire en l'absence d'O₂ ?

Principe: On met les spores en présence d'acide tartrique, en anaérobiose, pendant 4 heures. On les place ensuite sur un milieu non activateur à concentration et pH optima, à l'air ambiant, pendant 20 heures. Parallèlement, on fait germer des spores de la même population en aérobiose, respectivement 4 heures dans le tartrate puis 20 heures dans le citrate (témoin de l'activation en présence d'oxygène), 24 heures dans le tartrate (témoin de la germinabilité totale) et 24 heures dans le citrate (témoin de la germinabilité sans activation).

Technique de germination: sur membrane filtrante; la méthode pour la germination anaérobique est décrite dans la première partie de ce travail (Aragno, 1973).

Milieux de germination:

- 1) Solution d'acide tartrique 50 mM ramenée à pH 4.5 par NaOH
- 2) Solution d'acide citrique 50 mM ramenée à pH 4.5 par NaOH



Conclusion: l'activation se fait normalement en anaérobiose. Seule la suite du processus de germination exige la présence d'oxygène.

2.3 Activation et inhibiteurs

Il suffit que l'une des réactions essentielles du processus de la germination soit bloquée pour que l'apparition du tube n'ait pas lieu.

Nous allons faire l'essai de plusieurs inhibiteurs usuels sur l'ensemble du phénomène. Nous tenterons ensuite de situer leur action, soit dans la phase d'activation, soit après seulement, dans la phase prévégetative.

Nous avons essayé des inhibiteurs de la chaîne respiratoire: KCN et NaN_3 (cytochrome-oxydase) et antimycine A (cytochrome b / cytochrome c); de la phosphorylation oxydative: 2,4 dinitrophénol; de la synthèse des protéines: cycloheximide; de la glycolyse: NaF et iodoacétate; du transport: acétate d'uranyle. Ces inhibiteurs ne sont en général pas absolument spécifiques d'une réaction métabolique, sauf peut-être l'antimycine A.

L'essai sur toute la durée de la germination va nous permettre de déterminer la concentration minimale d'inhibiteur annulant complètement l'apparition du tube germinatif.

Méthode de germination: agar double couche, env. 5.10^5 spores/ml dans la couche supérieure.

Milieu de germination: milieu minimum, pH 4.5, gélosé à 1,4%, + inhibiteur (ajouté après refroidissement de l'agar à 45°C).

Incubation: 24 h à 27°C; on mesure ensuite le % de germination, qu'on exprime en fonction de la concentration de l'inhibiteur.

Résultats: fig. 3. La sensibilité des spores de *C. diplodiella* à NaN_3 est très élevée. La concentration active est plus faible que celle utilisée pour des spores d'autres champignons (ex. 2,5 mM chez *Penicillium* et *Trichoderma* (Martin et Nicolas, 1970); 1 mM chez *Rhizopus* (Ekundayo, 1966) et chez *Helminthosporium* (Mathre, 1969). Il en est de même du dinitrophénol.

La cycloheximide, l'acétate d'uranyle et KCN sont actifs à des concentrations comparables à celles expérimentées chez d'autres champignons.

L'antimycine A n'inhibe pas la germination à la concentration la plus forte que nous ayons pu obtenir (2 $\mu\text{g/ml}$):

Antimycine A ($\mu\text{g/ml}$)	% germination en 24 h
2	89
1	89
0.5	90
0.2	90
0	96

La croissance du tube germinatif est par contre fortement inhibée à 2 $\mu\text{g/ml}$.

A la plus faible concentration bloquant complètement la germination, nous allons voir si les inhibiteurs ci-dessus agissent sur la phase d'activation, ou sur la phase prévégetative seule.

Milieu de germination: acide tartrique – NaOH 50 mM, pH 4.5, gélosé à 1,4%; acide citrique – NaOH 50 mM pH 4.5 gélosé à 1,4%. Inhibiteurs à la concentration indiquée.

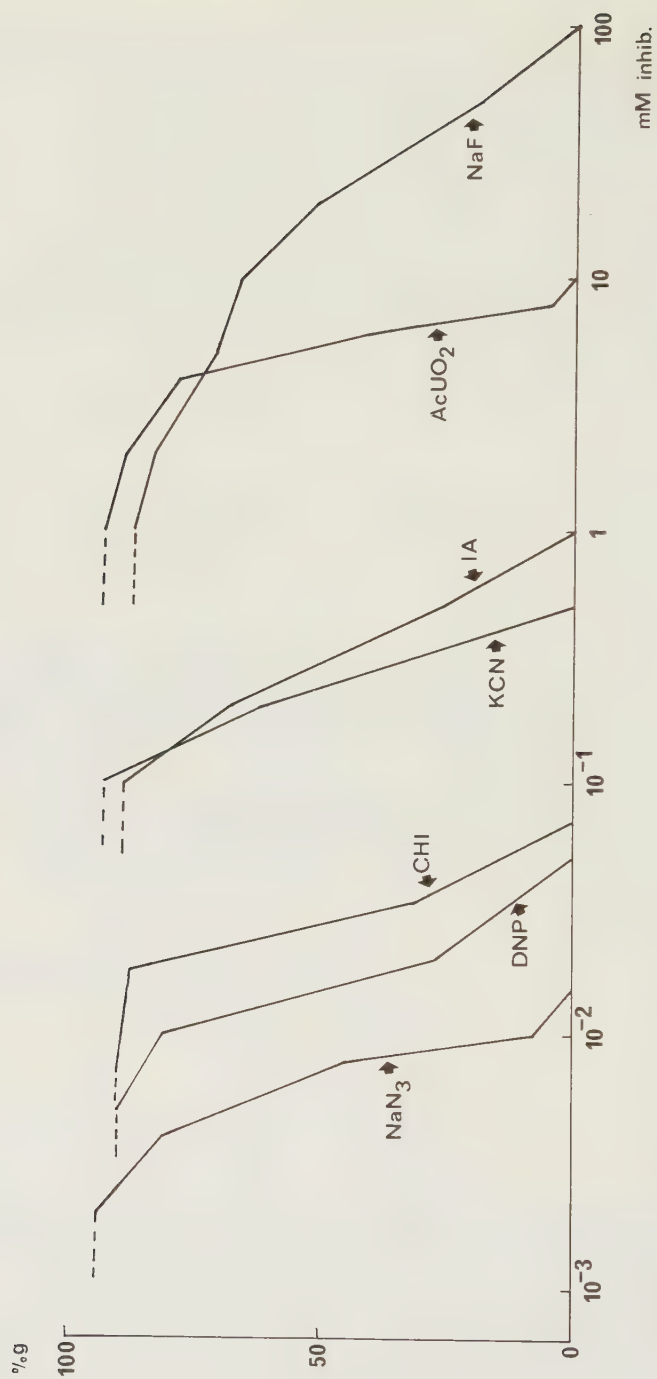


Fig. 3:

Germination en présence de différents inhibiteurs métaboliques.

% de germination en 24 heures à 27°C , dans le milieu minimum + inhibiteur, en fonction de la concentration de ce dernier (échelle semi-logarithmique). DNP: 2,4 dinitrophénol; CHI: cycloheximide; KCN: cyanure de potassium; IA: iodoacétate de sodium; AcUO_2 : acétate d'uranyle.

Technique de germination: sur membrane filtrante. 7 expériences en parallèle:

- 1) 4 h dans le milieu au tartrate + inhibiteur, puis 20 h dans le milieu au citrate, sans inhibiteur ($(T+I)_4C_{20}$) : essai de l'inhibition de la phase d'activation.
- 2) 4 h dans le milieu au tartrate, puis 20 h dans le milieu au citrate + inhibiteur ($T_4(C+I)_{20}$) : essai de l'inhibition de la phase prévégetative.
- 3) 4 h dans le milieu au tartrate + inhibiteur, puis 20 h dans le milieu au tartrate sans inhibiteur ($(T+I)_4T_{20}$) : essai de l'effet sporicide de l'inhibiteur.
- 4) 24 heures sur milieu au tartrate + inhibiteur ($(T+I)_{24}$) : témoin de l'inhibition totale de la germination globale.
- 5) 4 h dans le milieu au tartrate + 20 h dans le milieu au citrate (T_4C_{20}) : témoin de l'activation sans inhibiteur.
- 6) 24 h dans le milieu au tartrate (T_{24}) : témoin de la germinabilité totale.
- 7) 24 h dans le milieu au citrate (C_{24}) : témoin de la germinabilité sans activation.

Tableau 1:

Effet d'inhibiteurs sur les phases d'activation et prévégetative.

% de germination en 24 heures d'incubation totale. Explications: voir texte.

Inhibiteur	Concentration	$(T+I)_4C_{20}$	$T_4(C+I)_{20}$	$(T+I)_{24}$	$(T+I)_4T_{20}$	T_4C_{20}	C_{24}	T_{24}
NaN ₃	15 μ M	65	0	0	—	72	19	92
KCN	600 μ M	62	0	0	90	76	14	91
UO ₂ (CH ₃ COO) ₂	10 mM	63	0	0	—	78	18	91
NaF	100 mM	68	0	0	89	76	14	91
Iodoacétate	1 mM	21	0	0	87	78	21	94
Cycloheximide	71 μ M	30	0	0	90	76	14	91
2,4 dinitrophénol	50 μ M	16	0	0	82	76	14	91

Résultats: % de germination en 24 heures d'incubation totale, cf tableau 1.

Aux concentrations utilisées ici, NaN₃, KCN, UO₂(CH₃COO)₂ et NaF n'inhibent presque pas la phase d'activation, alors que la germination globale est complètement bloquée. La cycloheximide inhibe fortement l'activation; l'iodoacétate et le 2,4 dinitrophénol, complètement. Toutes ces substances, dans ces conditions, bloquent la phase prévégetative. Le 2,4 dinitrophénol montre un léger effet sporicide.

2.4 Désactivation

2.4.1 Effet d'un traitement au furfural

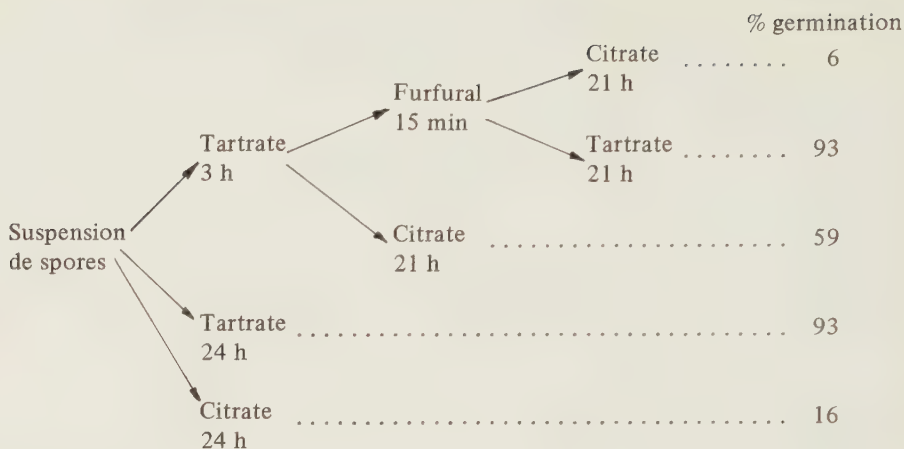
Lors d'essais infructueux d'activation avec le furfural (Aragno, 1973), nous avons observé que les spores normalement capables de germer sans tartrate étaient désactivées au contact de ce produit, à la concentration de 5 mM pendant 10 minutes. Le furfural est-il également à même d'annuler l'activation par l'acide tartrique?

Technique de germination: sur membrane filtrante

Milieux:

- 1) Ac. tartrique — NaOH 50 mM pH 4,5, agar 1,4%
- 2) Ac. citrique — NaOH 50 mM pH 4,5, agar 1,4%
- 3) Sol. furfural 5 mM imbibant un tampon de cellulose.

Schéma d'expériences et résultats:



Conclusion: le furfural, à une concentration de 5 mM et pendant 15 minutes, désactive presque complètement les spores de *C. diploidiella* préalablement activées par l'acide tartrique. Celles-ci ne sont toutefois pas tuées, et germent à nouveau si on les replace sur un milieu au tartrate.

2.4.2 Effet d'un séjour à 4°C

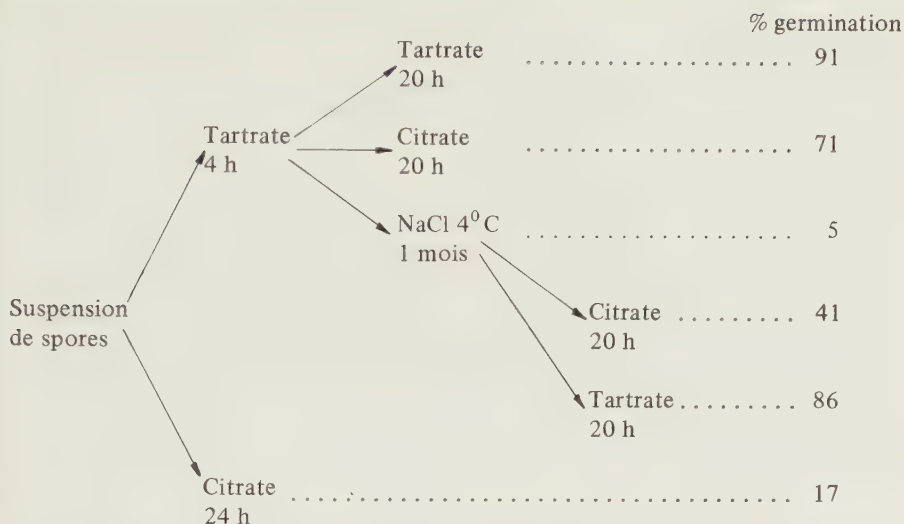
Chez les ascospores de *Neurospora tetrasperma* (Sun et Sussman, 1960), les sporangiospores de *Phycomyces blakesleeanus* (Halbgsuth et Rudolph, 1959) ou les urédospores de *Puccinia graminis* (Bromfield, 1964), on peut annuler l'effet de l'activation par un séjour subséquent au froid ou dans un milieu ne permettant pas la poursuite de la germination. Cette désactivation peut être relativement rapide, elle est complète chez *Neurospora* en 48 heures. Qu'en est-il chez *Coniella diploidiella*?

Principe: On active des spores pendant 4 h en présence de tartrate. On les place ensuite 1 mois sur un milieu non activateur (NaCl 50 mM) à une température inhibant la germination (4°C), puis on les met à germer 20 h sur un milieu non activateur, mais dans des conditions optimales de température et pH. Parallèlement, on observe sur la même population de spores: la viabilité après le séjour de 1 mois à 4°C (germination subséquente: 20 heures sur milieu au tartrate), la germination après le séjour de 1 mois à 4°C sans incubation subséquente, l'activation après 4 heures sur milieu au tartrate, mais sans séjour à 4°C, la germinabilité totale et la germinabilité sans activation.

Technique de germination: sur membrane filtrante. Incubation à 27°C. Séjour de 1 mois à 4°C sur milieu gélosé au NaCl.

- Milieux:
- 1) ac. tartrique — NaOH 50 mM pH 4,5, agar 1,4%
 - 2) ac. citrique — NaOH 50 mM pH 4,5, agar 1,4%
 - 3) NaCl 50 mM gélosé 1%

Schéma d'expériences et résultats:



Conclusions: le séjour d'un mois à 4° C n'a désactivé qu'une partie des spores. Celles-ci conservent donc leur état d'activation beaucoup plus longtemps que les ascospores de *Neurospora* (Sun et Sussman, 1960). Ce séjour n'altère pas sensiblement la viabilité des spores, tout en bloquant la germination.

3. Effet de la dessiccation

3.1 Résistance des spores dormantes à la dessiccation

Pour survivre aux conditions d'un environnement défavorable, les spores de *C. diploidiella* doivent présenter une résistance élevée à la dessiccation. On sait (Faes et Staehelin, 1935) que les spores prélevées sur des grappes desséchées depuis 15 ans germent encore. Terrier (1949) en observe de même ayant survécu plus de 20 ans.

Des spores sont déposées, par filtration d'une suspension dans l'eau distillée, sur membrane Sartorius SM 11 302, puis placées 24 heures à température ambiante dans un dessiccateur avec P₂O₅. Les filtres sont ensuite déposés sur le milieu de germination (acide tartrique - NaOH 50 mM, pH 4,5, gélosé à 1,4%). Incubation: 24 h à 27° C. Comme témoin, on met à germer dans les mêmes conditions des spores n'ayant pas subi de dessiccation.

Résultats:	% germination en 24 h
Spores préalablement desséchées	72
Spores non desséchées	86

Une grande partie des spores dormantes reste donc viable après dessiccation.

3.2 Modification de la résistance à la dessiccation au cours de la germination

Une résistance élevée à la dessiccation, bien connue chez de nombreuses espèces de champignons (Fletcher et Morton, 1970), est souvent l'apanage des spores dormantes, les cellules végétatives étant tuées par le dessèchement. C'est le cas chez *C. diploidiella*. A quel moment de la germination cette perte de résistance apparaît-elle?

Principe: les spores sont déposées sur des membranes filtrantes (Sartorius SM 11 302) par filtration d'une suspension dans NaCl 50 mM. Les membranes sont ensuite déposées pendant 0, 1, 2, 3 et 4 heures sur le milieu de germination (acide tartrique - NaOH, 50 mM, pH 4.5, gélosé à 1,4%), puis les spores sont lavées par filtration d'eau stérile. On met les filters pendant 24 heures dans un dessiccateur avec P₂O₅, puis on les replace sur les milieux de germination à 27°C pendant 24 heures. On mesure alors le % de germination. Témoin: germination des spores non desséchées, en 24 heures à 27°C sur le même milieu.

Résultats: fig. 4. Le graphe -o- représente les valeurs mesurées, soit le % de germination en 24 heures, en fonction du temps d'activation avant la dessiccation. Nous avons représenté sur ce même graphique (graphe -x-) les résultats de la même expérience, exprimés en % de spores tuées par le sec à la suite de l'activation, soit: $100 - \% \text{ germination} \times \frac{100}{72}$. La perte de résistance à la dessiccation est donc rapide, et atteint 50% en 2,2 heures.

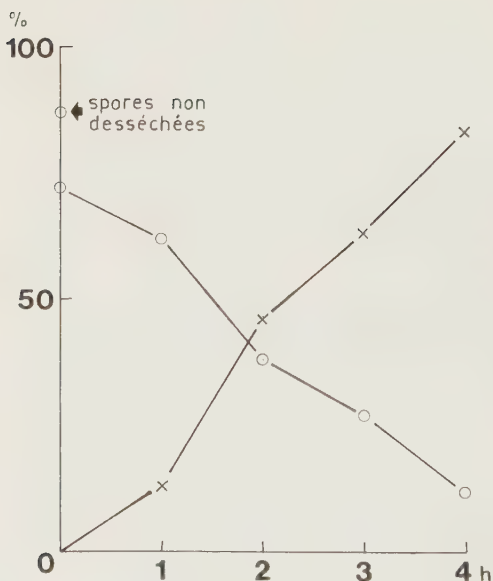


Fig. 4:

Perte de la résistance à la dessiccation au cours du processus de la germination, dans le milieu minimum à 27°C.

- o-: % de germination de spores mises à germer 1, 2, 3 et 4 heures dans le milieu minimum, puis séchées 24 h sur P₂O₅ et remises à germer 24 h dans le même milieu.
- x-: même expérience, résultats exprimés en % de spores ayant perdu leur résistance au dessèchement à la suite de l'activation.

Discussion

1. Type de dormance

Selon la définition de Sussman et Halvorson (1966), toute restriction du développement imposée par des facteurs en relation avec la structure ou des fonctions propres à la cellule doit être considérée comme une *dormance constitutive*. Ce type de dormance ne peut être levé que par un traitement qui n'est pas indispensable au développement végétatif de l'organisme.

A l'opposé, le seul traitement nécessaire à briser la dormance *environnementale* est le retour à des conditions permettant le développement végétatif.

On peut considérer la dormance des spores de *C. diplodiella* comme constitutive: la spécificité étroite pour l'acide tartrique et le mécanisme (encore inconnu) de l'activation sont en relation avec des facteurs propres à la cellule. Si le champignon n'a pas besoin de cet acide pour son développement végétatif, il est toutefois

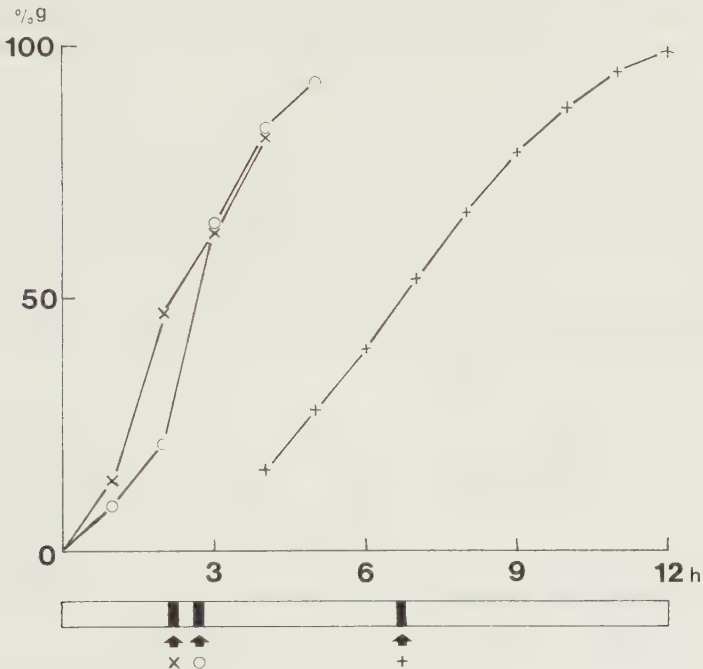


Fig. 5:

Représentation synoptique de différents événements survenant lors de la germination.

En haut: cinétiques.

- x-: Perte de la résistance à la dessiccation.
- o-: Fin de la phase d'activation.
- +-: Apparition des tubes germinatifs.

En bas: temps moyens, mêmes symboles.

capable de le métaboliser, et même de l'utiliser comme seule source de carbone (Terrier, 1948, in Turian et Staehelin, 1954). D'autre part, le retour au milieu naturel suffit à briser la dormance. Les définitions de Sussman et Halvorson (op. cit.) ne s'appliquent pas bien à *C. diplodiella*, qui serait un cas limite.

2. L'activation par l'acide tartrique

2.1 Les événements du processus de germination

Il est malheureusement impossible, en général, d'étudier dans une seule spore la succession des événements de la germination. On doit donc estimer leur durée dans une population.

La fig. 5 donne une représentation synoptique des différents événements survenant lors de la germination: perte de résistance à la dessiccation, fin de la période d'activation, apparition des tubes germinatifs.

La perte de résistance à la dessiccation précède de peu le moment où la spore n'a plus besoin d'une source exogène d'acide tartrique, les temps moyens étant respectivement de 2,2 et 2,7 heures dans nos essais. L'apparition du tube germinatif a lieu nettement plus tard, 6,8 heures en moyenne après le début du processus.

2.2 Particularités de l'activation

Comme nous l'avons vu p. 58, nous distinguons deux phases dans la germination des spores de *C. diplodiella* en présence d'acide tartrique: une phase d'*activation*, suivie d'une phase *prévégétative*. La phase d'activation se distingue nettement de la suivante par plusieurs caractéristiques physiologiques, que nous résumons dans le tableau 2.

L'insensibilité envers un inhibiteur peut être due à son absence d'action dans le processus d'activation, mais aussi à l'existence d'une barrière empêchant sa pénétration dans la spore au repos.

Tableau 2:

Comparaison des propriétés physiologiques des phases d'activation et prévégétative.

<i>Phase d'activation</i>	<i>Phase prévégétative</i>
Présence d'acide tartrique nécessaire dans le milieu pour assurer la germination	Les spores n'ont plus besoin d'acide tartrique pour germer
Anaérobie facultative	Aérobie stricte
Peu ou pas inhibée par:	Complètement inhibée par:
	NaN_3 15 μM $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 mM KCN 0.6 mM NaF 100 mM
Les spores sont encore résistantes à la dessiccation	Les spores sont tuées par la dessiccation
Faible augmentation de volume	Plus forte augmentation de volume

Une caractéristique importante de l'activation est son indépendance envers l'oxygène. Elle peut expliquer l'insensibilité vis-à-vis des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (NaN_3 , KCN, antimycine A). Pendant l'activation, les spores sont, par contre, sensibles au même point qu'en phase prévégétative au 2,4 dinitrophénol, à l'iodoacétate et, dans une moindre mesure, à la cycloheximide. Si l'action de ces inhibiteurs est ici la même que celle qu'on leur attribue généralement, alors la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative, la glycolyse (mais NaF n'est pas inhibiteur!) et éventuellement la synthèse des protéines sont impliquées dans l'activation.

L'existence d'une phase fermentative au début du processus de la germination a été constatée chez plusieurs espèces de champignons: *Phycomyces blakesleeanus* (Halbsguth et Rudolph, 1959; Rudolph, 1960 et 1961); ascospores de *Neurospora* (Sussman, 1961) et conidies de *Fusarium solani* (Cochrane et al, 1963). Chez les spores dormantes des deux premiers, les enzymes de la chaîne respiratoire sont présents, il manque en revanche ceux du cycle de Krebs.

L'effet de l'activateur est, d'autre part, rapidement annulé par le furfural 5 mM. Au contraire, un séjour à 4°C ne désactive que lentement les spores. Ces faits sont difficiles à interpréter. Une substance formée en présence d'acide tartrique, et nécessaire à l'activation, pourrait être détruite par le furfural; une telle substance pourrait également être dégradée par la spore maintenue dormante à 4°C, mais très lentement. En tous cas, nous constatons qu'il existe de grandes différences entre la physiologie des spores de *C. diplodiella* et de celles d'autres espèces, en particulier des ascospores de *Neurospora*, différences que nous résumons dans le tableau 3.

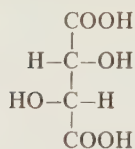
Tableau 3:

Comparaison des propriétés de l'activation chez *C. diplodiella* et *Neurospora sp.*

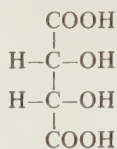
<i>Coniella diplodiella</i>	<i>Neurospora sp.</i> (ascospores)
L'acide L(+) tartrique, accessoirement les acides D(+) malique et mesotartrique, sont activateurs	?
Un choc thermique n'a pas d'effet activateur	Les ascospores sont activées par un choc thermique
Pas d'effet du phényl-éthyl-alcool 5 mM pendant 6 h	Le phényl-éthyl-alcool pendant 6 h active les ascospores
Le furfuraldéhyde 1 mM pendant 10 minutes n'a pas d'effet marqué. 5 mM pendant le même temps désactivent les spores activées par le tartrate.	Les ascospores sont activées par un traitement de 10 minutes au furfuraldéhyde 1 mM
Les spores ne sont que partiellement désactivées par un séjour d'un mois à 4°C.	Les spores sont complètement désactivées par un séjour de 24 h à 4°C.

2.3 Spécificité de l'activation

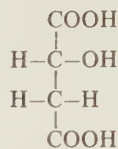
La structure des différents acides provoquant la germination et de leurs stéréoisomères est la suivante (projection de Fischer):



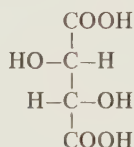
L(+)tartrique



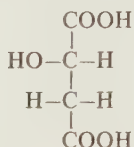
meso-tartrique



D(+)malique

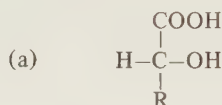


D(-)tartrique

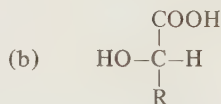


L(-)malique

Les substances activatrices ont toutes la structure:



Les stéréoisomères non activateurs de ces substances ont par conséquent la structure opposée:



Les symboles L et D ne sont pas liés directement à ces structures, mais proviennent de la nomenclature des oses, ce qui entraîne une confusion regrettable (Vickery, 1957). En appliquant la nouvelle nomenclature (R, S) on devrait désigner comme suit les différents acides:

anciennement:	R, S
L(+)tartrique	2(R), 3(R) (+)tartrique
D(+)malique	R(+)malique
meso-tartrique	2(R), 3(S)tartrique
D(-)tartrique	2(S), 3(S) (-)tartrique
L(-)malique	S(-)malique

(d'après Adiaanse et Pilnik, 1969)

La structure (a) correspond alors à R.

Une spécificité aussi étroite, en relation, semble-t-il avec un groupement chimique défini, nous incite à penser que, lors de l'activation, intervient un enzyme dont l'acide tartrique serait le substrat principal.

Ainsi s'expliquerait la meilleure germinabilité des spores formées sur un milieu contenant cet acide (Aragno, 1973): l'enzyme responsable de l'activation ou un précurseur serait synthétisé lors de la formation ou de la maturation des spores. Cette synthèse serait stimulée par la présence du substrat agissant alors comme inducteur.

Sussman et Halvorson (1966) défendent l'idée d'une base enzymatique de la germination chez des spores activées par des métabolites, ou par des substances affectant le métabolisme. Ils relèvent pour cela les faits suivants:

- 1) Nature stéréospécifique de l'activation.
- 2) Dépendance de la température, comme un système enzymatique.
- 3) Blocage de la germination par certains poisons métaboliques.

Nous observons ces trois phénomènes chez *C. diplodiella*.

Il n'est toutefois pas absolument exclu que la paroi sporale intervienne dans la spécificité: on sait que des membranes dialysantes artificielles, présentant des groupements à carbones asymétriques, peuvent laisser passer sélectivement l'un des deux isomères de l'acide tartrique (Klingmüller et Gedenk, 1957).

2.4 Hypothèses sur le mode d'activation

L'acide tartrique pourrait intervenir de deux manières lors de l'activation: soit en tant que métabolite; soit, sans être utilisé directement dans une voie métabolique, comme inhibiteur, répresseur, inducteur, etc. d'une réaction enzymatique liée à la dormance ou à l'activation. Dans le premier cas, un mécanisme possible de l'activation serait celui représenté à la fig. 6.

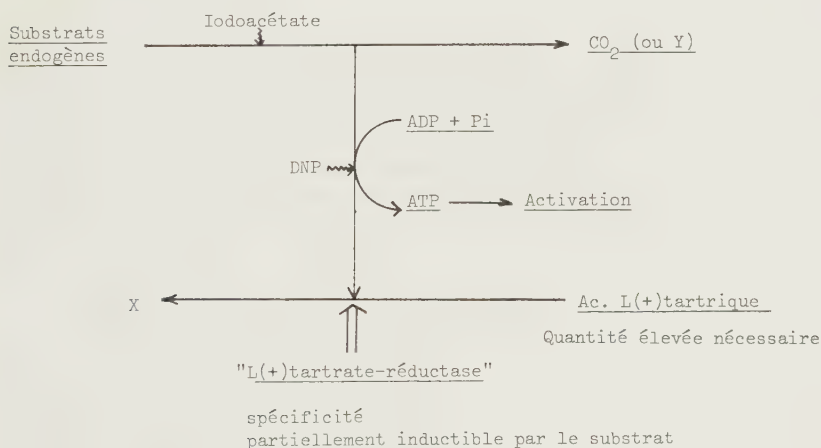


Fig. 6:

Mécanisme hypothétique de l'activation par l'acide tartrique.

L'acide tartrique fonctionnerait alors comme accepteur d'électrons, permettant l'écoulement du flux provenant de l'oxydation d'un substrat endogène. Ce flux serait couplé à une phosphorylation anaérobie, l'ATP formé étant la source d'énergie pour l'activation.

L'enzyme catalysant la réduction de l'acide tartrique serait alors le siège de la spécificité étroite pour l'agent activateur. L'acide D(+)-malique agirait comme substrat accessoire, également susceptible d'être réduit.

Le découplage de la phosphorylation par le 2,4 dinitrophénol, ainsi que le blocage de la glycolyse par l'iodoacétate (au cas où les substrats endogènes seraient des glucides) auraient pour effet d'empêcher l'activation, le premier sans inhiber la réduction de l'acide tartrique, contrairement au second. Une étude plus poussée de la physiologie cellulaire de la spore pourrait être faite dans ce sens.

Autre explication possible de l'activation anaérobie: les spores, pendant cette période, ne feraient qu'accumuler de l'acide tartrique; l'activation proprement dite ne se produirait alors qu'après le retour à des conditions aérobies.

Nous avons vu (Aragno, 1973) que 10 pMoles d'acide tartrique par spore étaient nécessaires à assurer une bonne germination. Or, cette quantité d'acide cristallisée est trois à quatre fois plus volumineuse qu'une spore! Il semble donc difficile d'admettre que les spores puissent accumuler dans leur protoplasme une quantité suffisante d'acide tartrique. En outre, un tel besoin était l'hypothèse d'une participation métabolique anaérobie de l'acide tartrique dans le processus d'activation.

Résumé

L'auteur tente d'exprimer, par un modèle mathématique, des paramètres caractérisant la cinétique de l'apparition des tubes germinatifs.

Il distingue, dans le processus de la germination, une phase d'activation, où la présence d'acide L(+)-tartrique est nécessaire, suivie d'une phase prévégétative, où elle est superflue. La phase d'activation peut se dérouler en anaérobiose et en présence de certains inhibiteurs de la chaîne respiratoire. Elle est bloquée par des inhibiteurs de la glycolyse, de la synthèse des protéines et de la phosphorylation oxydative.

L'effet de l'activation par l'acide tartrique est annulé rapidement par un traitement au furfural, beaucoup plus lentement et partiellement par un séjour à basse température.

La perte de la résistance à la dessiccation intervient très tôt dans le processus de la germination.

Les caractéristiques de la phase d'activation font supposer qu'elle implique une réaction enzymatique dont l'acide L(+)-tartrique serait le substrat. Un modèle hypothétique du mécanisme de l'activation est proposé.

Summary

The author tries to express, by a mathematical model, parameters characterizing the kinetics of germ tube protrusion.

In the germination process, he distinguishes an activation phase, in which L(+) tartaric acid is necessary, followed by a prevegetative one, in which this acid is needless. The activation phase may occur in anaerobiosis and in presence of some inhibitors of respiratory chain. It is blocked by inhibitors of glycolysis, protein synthesis and oxidative phosphorylation.

The tartaric acid activation is reversed, rapidly by a treatment with furfural, very slowly and partially by a storage at low temperature.

The loss of resistance to dessiccation appears quickly in the germination process.

The characteristics of activation phase lead to suppose that it involves an enzymatic reaction, with L(+) tartaric acid as substrate. An hypothetical model of the activation mechanism is proposed.

Zusammenfassung

Der Autor versucht, die Kinetik der Sporenkeimung mit einem mathematischen Modell zu erfassen.

Er unterteilt den Keimungsprozess in eine Keimstimulationsphase, wobei L(+) Weinsäure notwendig ist, und eine vorvegetative Phase wozu L(+) Weinsäure nicht nötig ist. Die Keimstimulationsphase kann sich in Anaerobiose abspielen und mit gewissen Hemmstoffen der Atmungskette. Sie ist aber durch die Hemmstoffe der Glycolyse, der Proteinsynthese und der oxydativen Phosphorylation blockiert.

Die Keimstimulation durch Weinsäure ist durch eine Furfuralbehandlung schnell zerstört, viel langsamer und teilweise durch einen Aufenthalt in tiefer Temperatur.

Der Verlust des Widerstandes gegen die Austrocknung kommt sehr früh im Keimungsprozess vor.

Die Eigenschaften der Keimstimulationsphase geben zur Vermutung Anlass, dass eine enzymatische Reaktion stattfindet, wobei L(+) Weinsäure das Substrat wäre. Es wird ein hypothetisches Modell des Mechanismus der Keimstimulation vorgeschlagen.

Bibliographie

- Adiaanse A. et W. Pilnik 1969. Nomenclature of lactic, malic and tartaric acids. Ber. Wiss.-Tech. Komm. Int. Fruchtsaftunion 9, 221-230.
- Aragno M. 1973. Etude de la germination des pycnidiospores de *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd., agent du coïtre de la vigne. I. Conditions de la germination. Bull. Soc. Bot. Suisse 83 (3), 223-251.
- Bromfield K.R. 1964. Phytopathology 54, 68-74.
- Cochrane V.W., J.C. Cochrane, C.B. Collins et F.G. Serafin 1963. Spore germination and carbon metabolism in *Fusarium solani*. II. Endogenous respiration in relation to germination. Am. J. Bot. 50, 806-814.
- Ekundayo J.A. 1966. Further studies on germination of sporangiospores of *Rhizopus arrhizus*. J. Gen. Microbiol. 42, 283-291.
- Faes H. et M. Staehelin 1935. Le coïtre de la vigne (*Coniothyrium diplodiella*). Progr. Agric. et Vitic. 56, 108, 134, 158, 187, 258, 281.
- Fletcher J. et A.G. Morton 1970. Physiology of germination of *Penicillium griseofulvum* conidia. Trans. Brit. Mycol. Soc. 54, 65-81.
- Goddard D.R. 1935. The reversible heat activation inducing germination and increased respiration in the ascospores of *Neurospora tetrasperma*. J. Gen. Physiol. 19, 45-60.
- Halbgsuth W. et H. Rudolph 1959. Arch. Mikrobiol. 32, 296-308.
- Klingmüller V.O.G. et G. Gedenk 1957. Asymmetric dialysis of racemates. Nature 179, 367.
- McCormick N.G. 1964. Biochem. Biophys. Res. Comm. 14, 443-446.
- Martin J.F. et G. Nicolas 1970. Physiology of spore germination in *Penicillium notatum* and *Trichoderma lignorum*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 55, 141-148.
- Mathre D.E. 1969. Physiology of thick walled spores of soil borne plant pathogenic fungi. I. Respiration and germination of *Helminthosporium sativum* and *H. pedicellatum* spores. Can. J. Bot. 47, 1513.
- Rudolph H. 1960. Planta 55, 424-437.
- 1961. Planta 57, 284-312.
- Sun C.Y. et A.S. Sussman 1960. Reversible deactivation of *Neurospora* ascospores by low temperature. Am. J. Bot. 47, 589-593.
- Sussman A.S. 1961. The role of trehalose in the activation of dormant ascospores of *Neurospora*. Quart. Rev. Biol. 36, 109-116.
- et H.O. Halvorson 1966. Spores: their dormancy and germination. Harper, New York, 354 pp.
- Terrier Ch. 1949. Le problème que pose la lutte contre le coïtre. Rev. romande Agric. Vitic. Arboric. 5, 89-91.
- Turian G. et M. Staehelin 1954. Nouvelles recherches sur le champignon du coïtre de la vigne (*Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.). Ann. Agr. Suisse 55, 987-997.
- Vickery H.B. 1957. Assignment of D and L prefixes to the tartaric acids. J. Chem. Educ. 34, 339-341.

Michel Aragno
Institut de Botanique de l'Université
CH-2000 Neuchâtel 7

Etude de la germination
des pycnidiospores
de *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.,
agent du coître de la vigne.
III. Formation et maturation des spores;
évolution de la paroi sporale
lors de la maturation et de la germination.

par *Michel Aragno*

Laboratoire de Cryptogamie
Institut de Botanique de l'Université de Neuchâtel

Extrait du
«Bulletin de la Société botanique suisse»
1974, tome 84, No. 4

Publié comme tirage à part le 30 septembre 1975

Etude de la germination
des pycnidiospores
de *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.,
agent du coître de la vigne.
III. Formation et maturation des spores;
évolution de la paroi sporale
lors de la maturation et de la germination.

par Michel Aragno

Laboratoire de Cryptogamie
Institut de Botanique de l'Université de Neuchâtel

Manuscrit reçu le 18 mars 1974

Pour compléter nos études sur les conditions et le processus de la germination des spores de *C. diplodiella* (Aragno, 1973 et 1974), nous nous sommes intéressé, d'une part à la formation et à la maturation des spores, et d'autre part aux manifestations morphologiques et ultrastructurales de la germination.

L'étude caryologique de la sporogénèse nous permettra de savoir si les spores provenant d'une culture monosporée possèdent plus d'un type de noyau, et peuvent présenter par conséquent des différences dans leur génome.

Nous chercherons à établir à partir de quel degré de maturité les spores présentent des qualités optimales pour la germination.

Nous décrirons ensuite l'aspect morphologique du processus de la germination tel qu'il apparaît en microscopie photonique.

Enfin, l'étude en microscopie électronique de la paroi sporale lors de la maturation nous permettra de mieux comprendre sa structure dans la spore au repos, et son évolution ultérieure lors de la germination.

Matériel et méthodes

Les souches, milieux et méthodes décrits dans la première partie de ce travail (Aragno, 1973) sont repris ici.

Pour les observations caryologiques en microscopie optique, le matériel est fixé au Helly pendant 8 heures, puis lavé, déshydraté et inclus dans de la paraffine. Les coupes microtomiques sont collées sur lames au moyen d'eau albuminée. Après réhydratation, on pratique la coloration nucléaire de Feulgen (temps d'hydrolyse dans HCl 1N à 60°C : 15 minutes; séjour dans le réactif de Schiff: 4 h; contre-coloration : 2 min dans une solution aqueuse à 1% de vert-lumière). Les coupes sont ensuite déshydratées, passées dans le toluène et montées au Caedax.

Pour les observations en microscopie électronique, les spores sont fixées 30 min au KMnO_4 1% dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,0, puis lavées 3 fois par centrifugation et resuspension du culot dans du même tampon. Après la dernière centrifugation, le culot est mis en suspension dans une goutte d'agar 1,5% fondu et refroidi à 45°C. Après solidification, l'agar est découpé en petits cubes de 1 mm de côté environ. Ces petits cubes sont déshydratés dans des solutions à concentration croissante d'acétone, puis inclus dans une résine époxyde. Les coupes ultra-microtomiques sont contrastées par immersion 1 h dans l'acétate d'uranyle à 4% aq., puis 2 minutes dans une solution alcaline de citrate de plomb, et enfin rincées dans KOH 20 mM.

Les spores en germination sont incluses vivantes et dormantes dans l'agar, qui est ensuite découpé en petits cubes de 1 mm de côté. Ceux-ci sont alors plongés le temps voulu dans une solution agitée du milieu de germination. La fixation est opérée sur les cubes d'agar, et prolongée à 60 min. Le lavage se fait par décantation, et non par centrifugation.

Résultats

1. Etude caryologique de la sporogénèse

L'appareil sporogène de *Coniella diplodiella* (pl. I, 11 et pl. II, 10) est localisé au fond des pycnides. Il comporte un massif lenticulaire (m), sorte de placenta reposant sur le plancher (p), dont il se distingue par les parois hyalines et minces de ses cellules. Celles-ci sont plus ou moins isodiamétriques, plurinucléées, et fortement vacuolées. La face supérieure de ce tissu est formée de cellules inter-médiaires (ci), uninucléées, portant les conidiophores (c). Ceux-ci, de forme allongée (10–20 x 1–2 μ) ont un cytoplasme dense, non vacuolé, et un noyau allongé, plus gros que ceux du tissu sous-jacent.

L'extrémité des conidiophores forme un renflement vacuolé (pl. I, 1 et II, 2). A ce moment, le noyau entre en division. Après le stade télophasique en forme de croissants (pl. II, 3) tel qu'il a été observé souvent chez d'autres champignons (Heim, 1952; Aragno, 1967 a et b), les noyaux-fils sont petits et denses (pl. I, 2 et 3; pl. II, 4 et 5). Le noyau antérieur migre dans le renflement (pl. I, 4 et II, 6), puis sa chromatine acquiert une structure plus lâche. Il en est de même de celui resté dans le conidiophore, qui redevient identique au noyau-père. Une paroi se forme à la base du renflement; la spore est ainsi individualisée (pl. I, 5 et 6; pl. II, 7). Après une première mitose (pl. I, 7–10, pl. II, 8 et 9), la spore binucléée se détache du conidiophore. Chacun des noyaux se divise encore une fois; ainsi, la spore est finalement tétranucléée (pl. II, 9). L'extrémité du conidiophore va se différencier en un nouveau renflement, et le cycle recommence pour la formation d'une nouvelle spore.

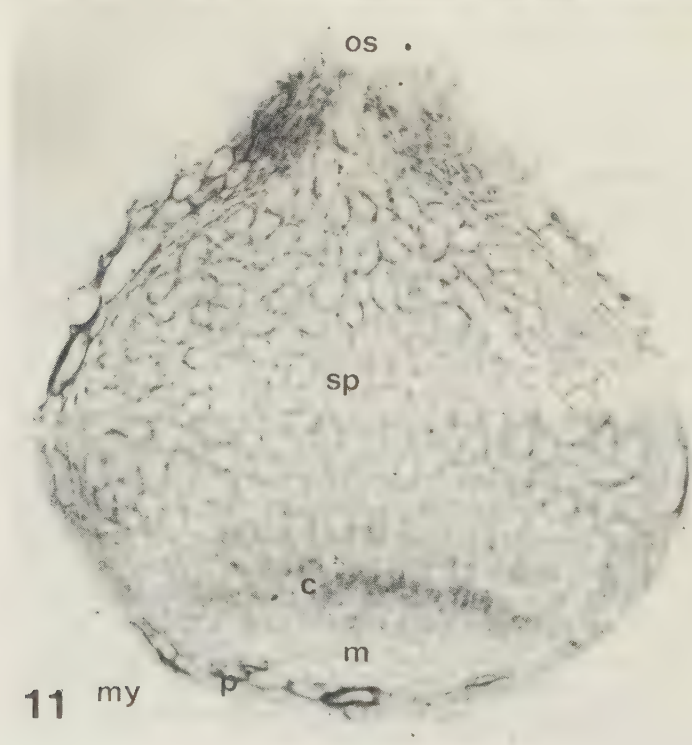
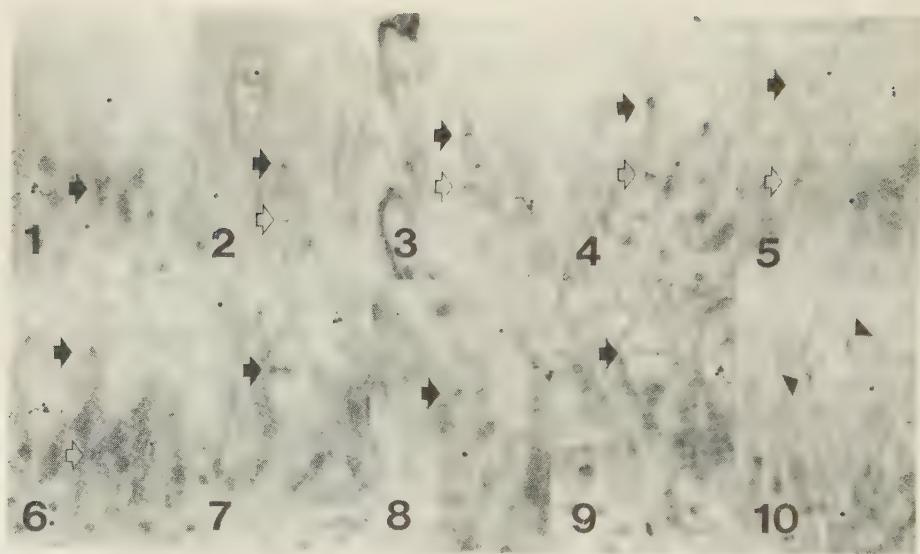


Planche I

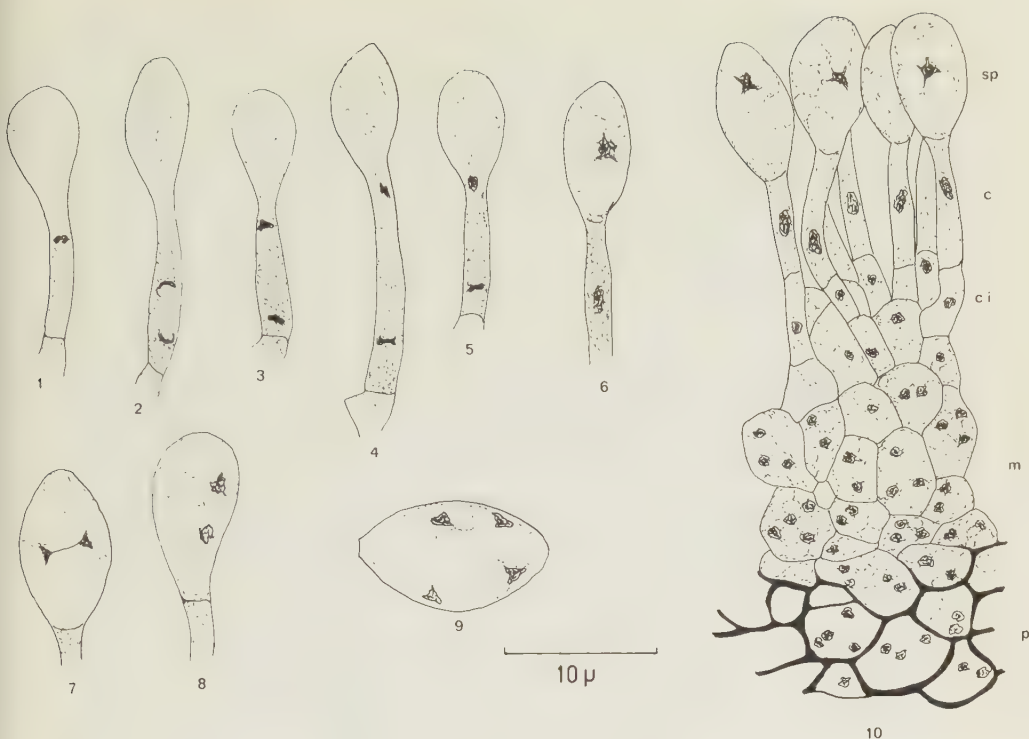


Planche II:

Sporogénèse chez *C. diplodiella*. 1: début de la mitose dans le conidiophore: noyau contracté; 2-3: stades télophasiques dans le conidiophore; 4-5: migration du noyau antérieur dans la future spore; 6: conidiophore avec spore uninucléée; 7: première mitose dans la spore; 8: spore binucléée, encore rattachée au conidiophore; 9: spore tétranucléée, libre. 10: *Détail de l'appareil sporogène*. p: paroi (plancher) de la pycnide. m: massif lenticulaire. ci: cellules intermédiaires. c: conidiophores. sp: spores (uninucléées).

La spore contient quatre noyaux frères: il n'y aura donc qu'un seul type de noyau dans une culture monosporée de ce champignon, qui donnera ainsi naissance à une population de spores génétiquement homogène.

◀ Planche I:

1-10: sporogénèse chez *C. diplodiella*. Gr. 1500 x; 1: début de la mitose dans le conidiophore; 2-3: fin de la mitose dans le conidiophore; 4: le noyau antérieur migre dans la future spore; 5-6: spore uninucléée; 7-9: première mitose dans la spore; 10: spore binucléée. 11: coupe d'une pycnide de *C. diplodiella*; gr. 600 x; Culture *in vitro* sur moût gélosé, âgée de 108 heures. Coloration nucléaire de Feulgen; my: mycélium sous-jacent; p: paroi (plancher) de la pycnide. m: massif lenticulaire; c: conidiophores; sp: spores; os: ostiole.

2. Maturation des spores

Sitôt après leur formation, les spores sont hyalines et contiennent de grosses vacuoles. Elles sont perméables à certains colorants (bleu coton lactique, soudan III).

Par la suite, leur paroi se pigmente. Le volume des vacuoles a tendance à diminuer, et les spores intactes sont imperméables aux colorants cités plus haut.

Les spores jeunes germant mal dans le milieu minimum décrit dans un travail précédent (Aragno, 1973), il importe donc de savoir à partir de quel âge des cultures la maturité des spores prélevées permet une bonne germination.

Une série de milieux (milieu F-T, voir Aragno, 1973) est inoculée à partir de blocs d'agar de 2 mm de côté environ découpés dans un mycélium jeune de *C. diplodiella* issu d'une seule spore. On mesure le % de germination en 24 heures des spores produites dans ces cultures, en fonction de leur âge, dans le milieu minimum de germination et dans une solution de tampon citrate non activatrice, de mêmes pH et concentration. On mesure en outre la proportion de spores apparaissant mélanisées à l'observation microscopique.

Préparation des spores: voir Aragno (1973). Chaque échantillon est un mélange des spores provenant de 6 tubes de culture.

Méthode de germination: goutte pendante, en chambre humide. Incubation à 27° C pendant 24 h.

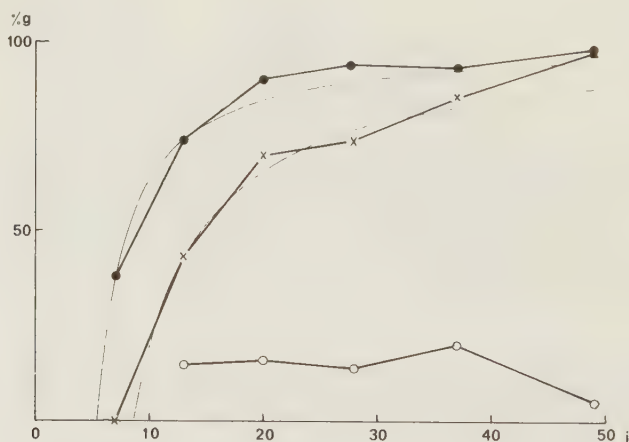


Fig. 1:

Germination et mélanisation des spores en fonction de l'âge de la culture.

- : % de germination en 24 h dans le milieu minimum (acide tartrique — NaOH, 50 mM, pH 4,0) à 27° C;
- : % de germination en 24 h dans un milieu non activateur (acide citrique — NaOH, 50 mM, pH 4,0) à 27° C;
- x-x-x- : % de spores mélanisées (observation en microscopie photonique). En traits fins: graphes de la fonction (1) p. 309 appliqué resp. à l'évolution de la germinabilité dans le tartrate et à la mélanisation.

Milieux de germination:

- a) tampon acide tartrique — NaOH 50 mM, pH 4,0 (milieu minimum de germination).
b) tampon acide citrique — NaOH 50 mM, pH 4,0 (milieu de référence, non activateur).

Résultats: fig. 1. La germination est satisfaisante (supérieure à 90%) à partir du 20^e jour de culture. Dans cette expérience, la proportion des spores germant en milieu non activateur était relativement importante, sauf chez des cultures de 49 jours.

La mélanisation apparaît plus tardivement que la germinabilité. Ceci est confirmé par l'observation fréquente de spores hyalines germant dans le milieu minimum.

Nous avons vu plus haut que la sporogénèse est continue, au moins pendant un certain temps. Un échantillon prélevé sur une culture se compose donc de spores d'âge différent, les plus âgées étant les premières apparues dans la culture, les plus jeunes étant juste formées au moment du prélèvement.

En supposant les conditions idéales suivantes:

- a) les premières spores sont formées a jours après la mise en culture.
b) dès ce moment, la production de spores est continue et constante.
c) elles sont capables de germer dans le milieu minimum b jours après leur formation.
d) la pigmentation de la paroi extérieure apparaît c jours après la formation,

nous pouvons établir le modèle algébrique suivant pour l'évolution de la germinabilité et de la mélanisation dans un échantillon de spores en fonction de l'âge de la culture:

$$(1) \quad y = \frac{100 (x-a-t)}{x-a} \quad \text{pour } x \geq a + t$$

$$(2) \quad y = 0 \quad \text{pour } x < a + t$$

où $t = b$ pour la germinabilité dans le milieu minimum

$t = c$ pour la mélanisation

$y =$ pour-cent de spores germées, resp. mélanisées

$x =$ âge de la culture, en jours

Plus la culture est jeune, plus les conditions réelles doivent être proches de celles supposées ci-dessus, le vieillissement devant inévitablement conduire au ralentissement, puis à l'arrêt de la formation des spores.

En appliquant à la fonction (1) ci-dessus les valeurs des deux premières mesures du % de germination en fonction de l'âge de la culture (38% en 7 jours, 74% en 13 jours) nous obtenons pour a et b les valeurs suivantes:

$$a = 2,7$$

$$b = 2,7$$

En appliquant à cette fonction la valeur de a obtenue ci-dessus et la valeur de la première mesure non nulle du % de mélanisation (42% en 13 jours), nous obtenons:

$$c = 5,9$$

Les graphes de la fonction (1) pour les paramètres calculés ci-dessus sont représentés à la fig. 1 (trait fin). Ils correspondent assez bien à ceux des résultats expérimentaux.

On peut ainsi admettre que les conditions réelles ne sont pas trop éloignées des suppositions idéales ci-dessus; nous estimons donc comme suit le déroulement de la maturation:

- apparition des premières spores: moins de trois jours après la mise en culture.
- germinabilité des spores dans le milieu minimum: acquise moins de trois jours après leur formation.
- mélanisation de la paroi: apparaît environ 6 jours après la formation de la spore.

3. Emission des spores

Faes et Staehelin (1935) ont fort bien observé l'émission des spores par les pycnides de *C. diplodiella*: lorsque celles-ci sont immergées dans l'eau, les cellules se gonflent et, par turgescence, la masse de spores jaillit par l'ostiole. Même sans immersion des pycnides, nous avons observé qu'une certaine quantité de spores est expulsée par l'ostiole après un certain temps de culture, probablement parce que le volume de la masse sporale dépasse alors celui de la pycnide.

Si les fructifications se vident sous l'effet de la turgescence, l'immersion dans des solutions hypertoniques ne devrait pas provoquer ce phénomène.

Des cultures de *C. diplodiella* sur milieu F-T (Aragno, 1973) sont recouvertes pendant 30 minutes de 2 ml de solutions de NaCl à différentes concentrations (4 cultures par concentration). On agite toutes les cinq minutes, sans racler la surface, puis on prélève les suspensions ainsi obtenues. On mesure la concentration dans un compte-globules de Thoma (2.10^{-4} ml). L'expérience est répétée deux fois, les résultats sont ramenés à : quantité de spores ayant diffusé dans l'eau distillée = 100.

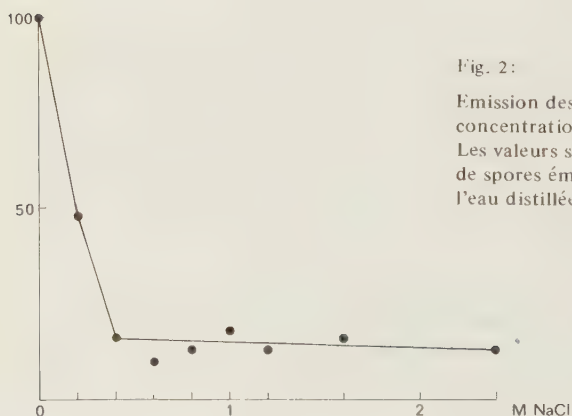


Fig. 2:

Emission des spores, en fonction de la concentration en NaCl du milieu d'immersion. Les valeurs sont ramenées à 100 = nombre de spores émises après immersion dans l'eau distillée.

Résultats: fig. 2. Le nombre de spores émises par la culture diminue fortement entre 0 et 0,4% NaCl. A partir de cette concentration, il se maintient entre 10 et 20% du nombre de spores émises dans l'eau distillée.

On peut distinguer ici deux phénomènes:

- 1) Emission „active“, dépendante de la concentration de NaCl, intéressant ici 80–90% des spores en suspension dans l'eau distillée.
- 2) Mise en suspension passive indépendante de la concentration en NaCl.
Il s'agit ici probablement de spores déjà sorties des pycnides au moment de l'immersion.

La „turgescence des cellules“ supposée par Faes et Staehelin (1935) ne se manifesterait donc qu'au-dessous de la concentration de 0,4% NaCl, qui serait alors à peu près isotonique. Mais, de quelles cellules s'agit-il? De celles de la paroi pycnidiale, des spores elles-mêmes? Le mucus dans lequel baignent les spores ne serait-il pas susceptible de se gonfler en présence d'une solution hypotonique? Ce problème n'est pas résolu.

4. Manifestations morphologiques du processus de la germination

Classiquement, on distingue deux phases morphologiques dans le déroulement de la germination des spores de champignons: le gonflement, puis la protrusion de l'hyphé germinative.

4.1 Le gonflement

Le gonflement est souvent peu marqué chez les conidies des Deutéromycètes. Nous l'avons estimé, chez *C. diplodiella*, par la mesure des axes des spores. L'observation directe, sous le microscope, ne permettant pas un nombre suffisant de mesures dans un court espace de temps, nous avons photographié les spores, puis mesuré leurs dimensions sur les photographies.

Méthode de germination: goutte pendante, en chambre humide.

Milieu de germination:

- a) Moût 20% dans du tampon glycine-HCl 50 mM, pH 3,5.
- b) tampon ci-dessus, seul.

Pour chaque valeur, on mesure les dimensions de plus de 300 spores. On établit la moyenne (μ) et l'écart-type de la moyenne (σ_M). Toute valeur B hors de l'intervalle $A \pm 3 \sigma_M$ sera considérée comme significativement différente de A, avec une probabilité supérieure ou égale à 0,995.

Résultats: fig. 3. Le gonflement se manifeste par une augmentation progressive du petit axe. La longueur du grand axe ne varie pas sensiblement. Notons que la mesure du grand axe est sujette à caution. En effet, on mesure, non sa vraie grandeur, mais sa projection sur le plan d'observation. En goutte pendante, les spores se rassemblent à la face inférieure de la goutte, leur grand axe tend à être parallèle à cette face. L'agitation (lors du transport de la chambre humide,

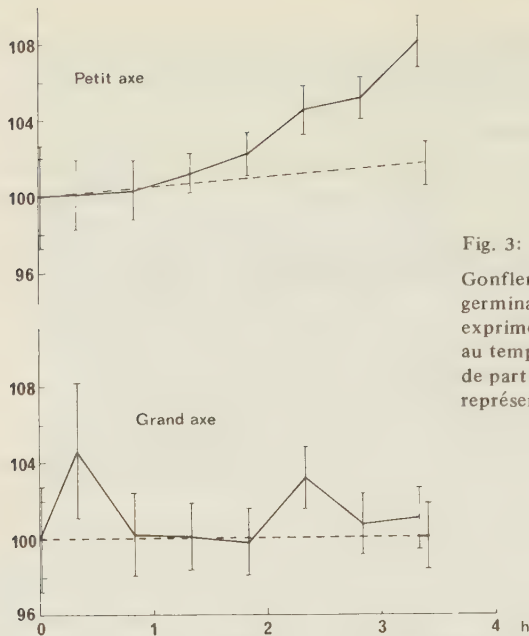


Fig. 3:

Gonflement des spores lors de la germination. Les dimensions sont exprimées en % des dimensions des spores au temps $t = 0$. Les intervalles indiqués de part et d'autre de chaque dimension représentent $\pm 3 \sigma_M$.

par exemple) peut modifier cet ordre, et donc la moyenne mesurée. Ceci explique probablement les variations discontinues mesurées dans notre expérience. Il n'en est pas de même du petit axe, qui est toujours vu en vraie grandeur, la spore ayant à peu près la forme d'un ellipsoïde de révolution.

Si, lors du gonflement, seul le petit axe varie, son augmentation en 3 h 20, de 8% environ, se traduit par un changement de volume de 16%, ce qui est relativement peu. Passé ce délai, de nombreuses spores ont germé, et on ne peut plus mesurer le gonflement.

Dans le tampon seul, et dans le même temps, on n'observe pas d'augmentation significative du petit axe des spores. Le gonflement est donc lié à l'activation, et il n'y a pas d'hydratation passive.

4.2 La protrusion du tube germinatif

Nous n'avons jamais noté de pore germinatif, ni même de lieu préférentiel pour la protrusion du tube, chez les spores de *C. diploidiella*. L'hyphe germinative peut apparaître à l'extrémité du grand axe (pl. III, 1) aussi bien que latéralement (pl. III, 2).

La première manifestation est une déchirure de la paroi pigmentée (pl. III, 3). La paroi sous-jacente est hyaline. C'est à partir de ce stade que nous considérons, dans nos comptages, une spore comme germée.

Le volume de la cellule s'accroît alors dans une notable proportion, et il se forme une ampoule (pl. III, 4 et 5) désignée comme „spore secondaire“ par Istvanffi (1902). A 37°C, la germination s'arrête là. A une température inférieure, l'apex se différencie rapidement (pl. III, 5 et 6). On observe, quoique rarement, la différenciation de deux apex à partir de l'ampoule initiale (pl. III, 7 et 8).

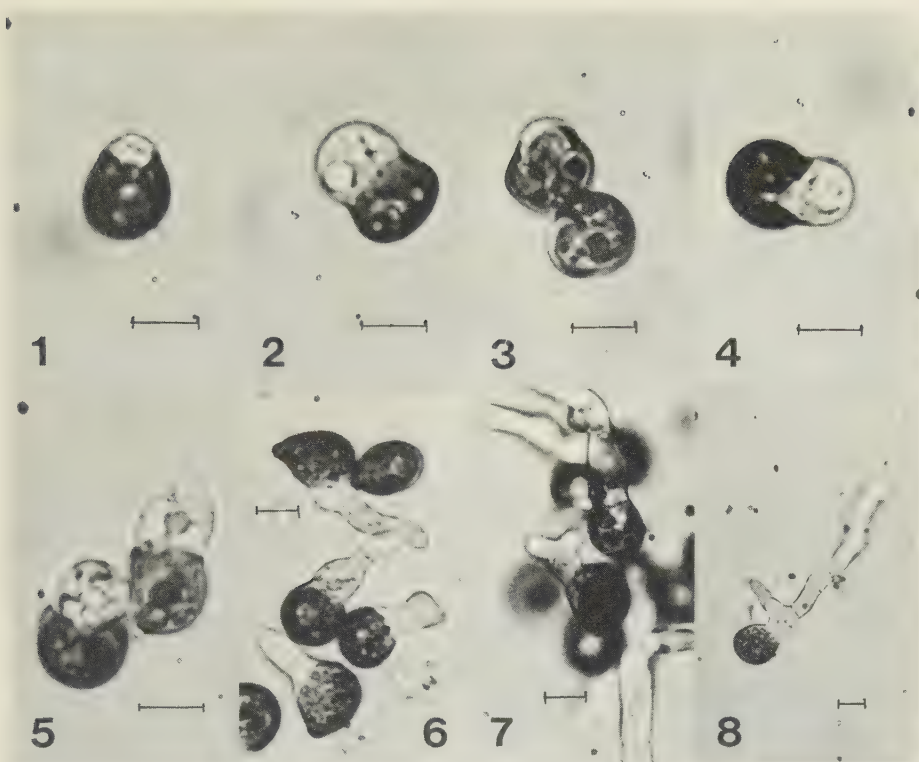


Planche III:

Germination. 1: apparition du tube germinatif à l'extrémité du grand axe de la spore; 2: apparition du tube germinatif en position latérale; 3: début de la protrusion du tube germinatif; 4 et 5: formation de l'ampoule germinative; l'ampoule de la spore de droite de la photo No 5 commence à se différencier en un apex; 6: croissance apicale plus avancée; 7 et 8: différenciation de deux apex sur une ampoule. La longueur des traits noirs représente 10 μ m.

5. Etude ultrastructurale de la paroi sporale, lors de la maturation et de la germination

5.1 Maturation

On distingue deux couches dans la paroi des jeunes spores non pigmentées (pl. IV, 1 et fig. 4, 1). La couche externe (A) est mince (30–40 nm en moyenne chez les spores très jeunes), d'apparence floconneuse et très opaque aux électrons. La couche sous-jacente (B) est tout d'abord transparente aux électrons. Son épaisseur (110–140 nm chez les plus jeunes) augmente avec l'âge. En même temps, il s'y dépose des inclusions plus opaques qui tendent à s'accumuler vers l'extérieur

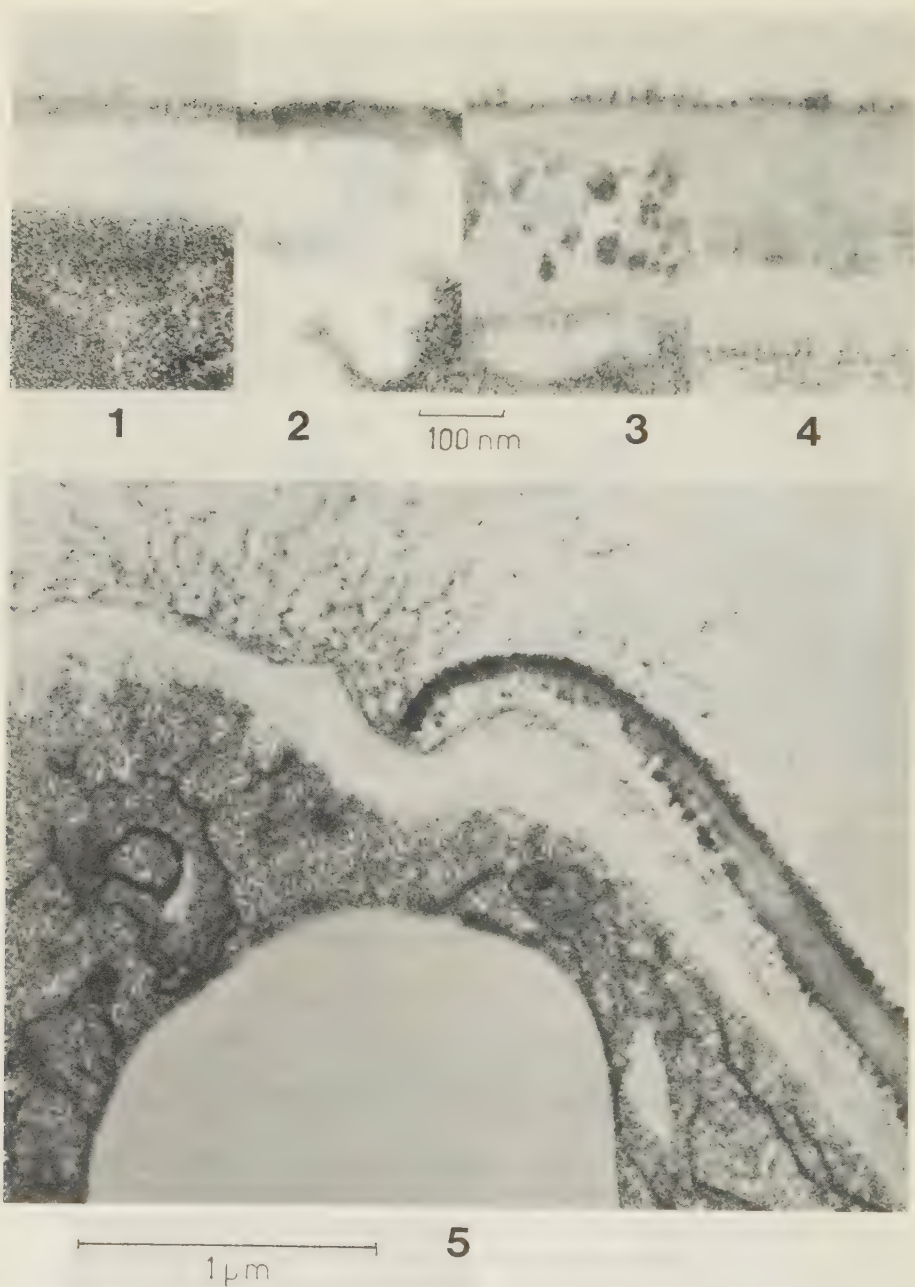


Planche IV:

Ultrastructure. 1: paroi d'une spore très jeune, non mélanisée; 2-3: parois de spores en voie de maturation; 4: paroi d'une spore mûre; 5: spore en germination (détail), explication: voir pl. V.



Fig. 4:

Diagramme représentant l'évolution de l'ultrastructure de la paroi sporale de *C. diplodiella* lors de la maturation. 1: spore très jeune, non pigmentée; 2: spore en voie de maturation; 3: spore mûre.

(pl. IV, 2 et 3, fig. 4, 2). Elles finissent par fusionner pour former une couche d'apparence plus ou moins homogène chez la spore mûre (pl. IV, 4 et fig. 4, 3). Chez celle-ci, on observe en outre une couche interne (C), hyaline. Il s'agit probablement de la face interne de la couche précédente, épaissie, qui reste transparente aux électrons.

La paroi de la spore mûre dormante (pl. IV, 4 et fig. 4, 3) présente donc trois couches distinctes:

- une couche externe, A, de 30–40 nm, floconneuse, très opaque aux électrons.
- une couche moyenne, B, de 200–260 nm, moins opaque.
- une couche interne, C, hyaline, de 80–135 nm.

Ces couches ressemblent, par leur nature et leur mode de formation, à celles décrites par Reisinger (1972) chez diverses espèces de Dématiées, en particulier *Dendryphiella vinosa* (Reisinger et Guedenet, 1968).

Il n'est pas démontré que le matériel opaque aux électrons s'accumulant dans la couche moyenne correspond au pigment apparaissant lors de la maturation. Vu la coïncidence des deux phénomènes, on peut toutefois considérer cette hypothèse comme très plausible.

5.2 Germination

Comme nous l'avons déjà vu en microscopie optique, la „couche externe mélanisée“ (comprenant ici les couches A et B) est rompue lors de la protrusion du tube germinatif (pl. IV, 5 et V). Vu la continuité de la couche A à proximité du point de rupture, l'amincissement de la couche B ne peut être dû à l'étirement, et on doit admettre que celle-ci est dégradée.

Au premier regard, il semble que la couche C se prolonge pour former le tube germinatif. En fait, nous observons, dans le tube germinatif et à son voisinage, une nouvelle couche (D), plus hyaline que C, de 40 nm environ. Dans l'apex, elle occupe l'extérieur de la paroi. Elle se trouve, dans la spore, à l'intérieur de la couche C. Elle n'y paraît pas continue, et n'est pas visible à l'opposé du tube germinatif.

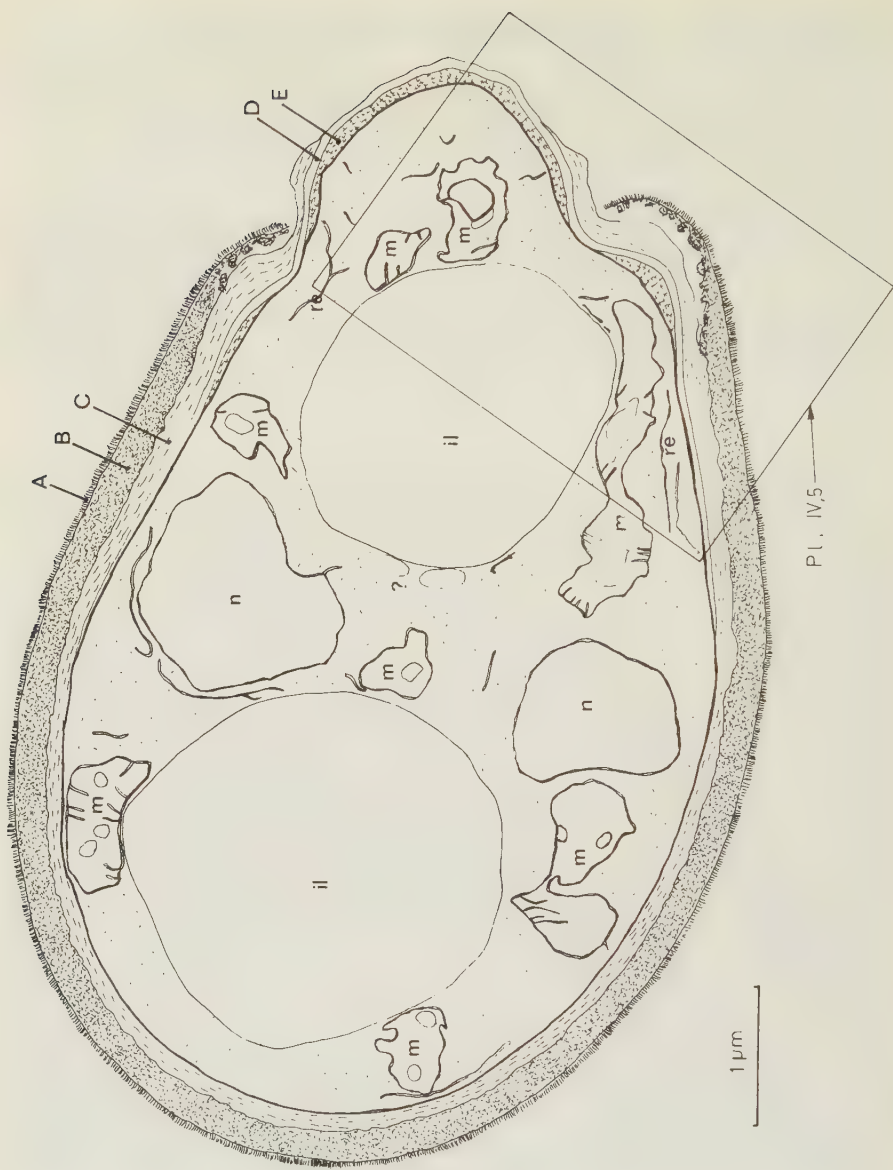


Planche V:

Dessin d'une coupe d'une spore de *C. diplodiella* en germination. A, B, C: couches de la paroi sporale; D, E: couches néoformées du tube germinatif; m: mitochondries; n: noyaux; il: inclusions lipidiques; re: réticulum endoplasmique.

A l'intérieur de cette couche très hyaline, on observe une strate discontinue, E, de même apparence que C, localisée au niveau du tube germinatif et à son voisinage. La couche C s'interrompt en revanche en bordure de ce tube.

Nous pensons que les couches D et E sont deux couches néoformées lors de la germination, et représentent le début de la formation de la paroi du mycélium végétatif. Le tube germinatif se formerait alors par protrusion à travers la couche C des deux couches D et E, et ne serait pas une extension, par intussusception, de la couche C.

Discussion

Turian (1969) distingue trois stades dans la germination: un stade physiologique d'activation, suivi d'un stade morphologique isodiamétrique (gonflement) et d'un stade morphologique polaire (différenciation apicale). Chez *C. diplodiella*, le gonflement est peu marqué. Avant la rupture de la paroi, on peut distinguer un premier stade morphologique polaire, qui se manifeste par la différenciation de la paroi végétative (D + E) dans la région du point d'émergence, et par la lyse de la couche B (pl. IV, 5 et V).

Suite à la rupture de la paroi sporale, il se forme une ampoule germinative, que l'on peut considérer comme un second stade morphologique isodiamétrique. A partir de celle-ci vont se différencier un ou deux axes de croissance mycélienne (second stade morphologique polaire). Cette dernière différenciation n'a pas lieu à 37°C et est fortement inhibée par le D-malate (Aragno, 1973).

La paroi sporale de *C. diplodiella* présente deux couches à l'état immature (non pigmenté) et trois à maturité. Nous avons utilisé la terminologie de Reisinger (1972) qui désigne des couches analogues chez les Dématiées par les lettres A, B et C; en effet, la terminologie classique (cuticule, épispore, endospore, ou bien paroi primaire, paroi secondaire) a été établie d'après des observations en microscopie photonique, et ne peut être sans autre appliquée à l'ultrastructure. Il est intéressant de noter que les pycnidiospores mélanisées d'une autre Sphérropsidale, *Botryodiplodia theobromae* Pat. présentent une structure analogue des parois des spores jeunes et matures (Ekundayo et Haskins, 1969).

On peut émettre deux hypothèses sur le mode de formation des couches B et C de la spore mûre:

- 1) La couche B de la jeune spore s'imprègne vers l'extérieur de substances opaques aux électrons, tout en s'accroissant vers l'intérieur. A maturité, la partie interne non imprégnée de ces substances forme la couche C.
- 2) La substance formant la couche B de la spore mûre s'intercale entre les deux couches de la jeune spore, repoussant ainsi la couche hyaline vers l'intérieur.

La formation des parois du tube germinatif a donné lieu à de nombreux travaux. Bartnicki-Garcia (1968) distingue trois types:

- I. La paroi végétative dérive directement de l'extension de la paroi sporale, ou de l'une de ses couches internes.
- II. Formation *de novo* de paroi cellulaire sur un protoplaste nu (Phycomycètes aquatiques, zoospores).
- III. Formation *de novo* d'une paroi végétative sous la paroi sporale.

A cette époque, on connaissait, germant selon le type I, des *Fungi imperfecti* (*Botrytis*, *Aspergillus*), des Ascomycètes (*Neurospora*, ascospores et conidies) et des Urédinées (*Melampsora*). Les zygomycètes étudiés (*Rhizopus*, *Cunninghamella*, *Gilbertella*, *Mucor*) germent selon le type III, ainsi qu'éventuellement *Fusarium culmorum* (Marchant, 1966) quoique les résultats de cet auteur soient mis en doute par Bartnicki-Garcia (op. cit.).

Depuis, la formation d'une nouvelle paroi lors de la germination a été observée chez d'autres Deutéromycètes, en particulier chez *Aspergillus nidulans* (Border et Trinci, 1970), *Botrytis cinerea* (Gull et Trinci, 1971, en contradiction avec Hawker et Hendy, 1963) et *Helminthosporium spiciferum* (Reisinger, 1972). L'observation précise de la formation ou non d'une nouvelle paroi lors de la germination peut dépendre du mode de fixation choisi (Border et Trinci, 1970). Les travaux antérieurs concluant à la continuité de la paroi du tube germinatif avec la paroi interne de la spore devraient être repris en utilisant la fixation préconisée par ces auteurs.

Chez *C. diplodiella* (pl. IV, 5 et V), la paroi du tube est néoformée à l'intérieur de la spore, bistratée, localisée au voisinage de la zone d'émergence. Il s'agit donc du type III de Bartnicki-Garcia.

Comme nous l'avons observé en microscopie optique, il semble qu'il n'y ait pas de structure germinative préformée, le tube pouvant apparaître aussi bien en position apicale que latérale. Toutefois, l'aspect de la couche B au voisinage du point d'émergence suggère une lyse enzymatique. En outre, la paroi du tube ne se forme, dans la spore, qu'au voisinage de ce point. La localisation du point d'émergence ne se fait donc pas au hasard d'une rupture de la paroi, mais doit être déterminée avant.

Conclusions générales

L'étude de la germination des pycnidiospores de *C. diplodiella* (Aragno, 1973, 1974 et le présent travail) nous aura permis de résoudre en partie les problèmes posés au départ.

Les conditions optimales de la germination correspondent bien aux propriétés du milieu offert par la pulpe des raisins en voie de maturation. Le caractère parasitaire s'exprime principalement par la nécessité d'un activateur spécifique pour

briser la dormance, l'acide L(+)tartrique, qui est un composant caractéristique de l'hôte. Le processus de la germination a été divisé en un certain nombre de phases, morphologiques et physiologiques. Si le mécanisme de l'activation n'a pas été élucidé, nous avons mis en évidence certaines de ses propriétés intéressantes, telles son indépendance vis-à-vis de l'oxygène et sa sensibilité différentielle vis-à-vis de divers inhibiteurs métaboliques.

Nous espérons, par notre modeste contribution, avoir apporté un peu de lumière sur le phénomène de la germination chez le champignon du Coître. Nous croyons que *C. diplodiella* est un matériel digne d'études plus poussées. La simplicité, la spécificité et l'unicité du mode d'activation permettent de poser clairement le problème du passage de l'état dormant à la vie végétative chez cette espèce, dont la germination est un bon exemple de relation „simple“ entre un parasite et son hôte.

Résumé

Lors de son individualisation, la pycnidiospore de *C. diplodiella* ne renferme qu'un noyau. Une culture monosporée sera donc génétiquement homogène.

Lors de la maturation des spores, la germinabilité en présence d'acide tartrique est acquise en moins de trois jours, et la mélanisation de la paroi en 6 jours environ.

Une partie des spores est émise spontanément hors des pycnides. Toutefois l'immersion dans une solution de concentration inférieure à 0,4% NaCl provoque une émission beaucoup plus importante, atteignant son maximum dans l'eau distillée.

Morphologiquement, la germination se manifeste par un gonflement peu marqué de la spore (15% du volume environ), suivi de la protrusion du tube germinatif. Celui-ci forme tout d'abord une ampoule, à partir de laquelle se différencient un, voire deux axes de croissance apicale.

La paroi des jeunes spores est bistratée, alors qu'elle présente trois couches à maturité. Lors de la germination, la paroi du tube est néoformée à l'intérieur de la paroi sporale, dans la zone de rupture de celle-ci.

Summary

The pycnidiospore of *C. diplodiella* contains only one nucleus at formation. Hence, a single spore culture will be genetically homogeneous.

In the maturation process, germinability in tartaric acid is acquired in less than three days, melanization in about six days.

A part of the spores is spontaneously discharged out of the pycnidia. Immersion in diluted NaCl solutions (less than 0,4%) leads to a more important discharge which is maximum in distilled water.

Morphologically, germination begins by a weak swelling (about 15% in volume) followed by the germ-tube protrusion. The latter forms first an ampulla which originates one, sometimes two axes of apical growth.

The young spore wall consists of two layers, the mature one of three layers. During the germination, the tube wall is newly formed within the spore wall, in the rupture zone.

Zusammenfassung

Die Pyknosporen von *Coniella diplodiella* enthalten während ihrer Bildung nur einen Kern; eine Einsporkultur ist deshalb genetisch homogen.

Während der Sporenreifung wird die Keimfähigkeit in Weinsäure in weniger als drei Tagen erreicht; die Melanisierung der Sporenwand benötigt etwa 6 Tage. Ein Teil der Sporen wird spontan aus den Pyknidien ausgeschieden; in einer NaCl-Lösung von weniger als 0,4% ist die Sporenausscheidung viel grösser und in destilliertem Wasser am grössten.

Die Keimung macht sich morphologisch durch eine geringe Quellung der Spore (ca. 15% des Volumens) bemerkbar, gefolgt vom Austritt des Keimschlauches. Dieser hat zunächst die Form einer Blase, aus der sich eine bis zwei Achsen apikalen Wachstums entwickeln.

Die Wand der jungen Sporen ist zweischichtig, diejenige der reifen Sporen dreischichtig. Bei der Keimung wird die Wand des Keimschlauches im Innern der Sporenwand in der Bruchzone neu gebildet.

Outre les personnes déjà citées dans la première partie de ce travail, et auxquelles nous réitérons nos remerciements, nous tenons à exprimer ici notre gratitude au prof. F. Mangenot et au Dr. O. Reisinger, de l'Université de Nancy, dont les conseils ont été une aide précieuse dans l'interprétation de l'ultrastructure de la paroi sporale.

Notre collègue J. Keller a réalisé les coupes et électromicrographies qui nous ont permis d'étudier quelques aspects ultrastructuraux de la spore de *C. diplodiella*. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance.

Bibliographie

- Aragno M. 1967a. Formation et évolution de l'asque chez *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fr. Bull. Soc. Bot. Suisse 77, 173–186.
- 1967b. Formation des ascospores plurinucléées chez *Sarcoscypha coccinea* (Scop. ex Fr.) Lambotte. Nova Hedw. 14, 571–583.
- 1973. Etude de la germination des pycnidiospores de *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd., agent du coître de la vigne. I. Conditions de la germination. Bull. Soc. Bot. Suisse 83 (3) 223–251.
- 1974. Etude de la germination des pycnidiospores de *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd., agent du coître de la vigne. II. Etude du processus de la germination. Bull. Soc. Bot. Suisse 84 (1) 53–72.
- Bartnicki-Garcia S. 1968. Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. Ann. Rev. Microbiol. 22, 87–108.
- Border D. et A.P.J. Trinci, 1970. Fine structure of the germination of *Aspergillus nidulans* conidia. Trans. Brit. Mycol. Soc. 54, 143–152.
- Ekundayo J.A. et R.H. Haskins, 1969. Pycnidium production by *Botryodiplodia theobromae*. II. Development of the pycnidium and fine structure of the maturing pycnospor. Can. J. Bot. 47, 1423.
- Faes H. et M. Staehelin, 1935. Le coître de la vigne (*Coniothyrium diplodiella*). Progr. Agric. et Vitic. 56, 108, 134, 158, 187, 258, 281.
- Gull K. et A.P.J. Trinci, 1971. Fine structure of spore germination in *Botrytis cinerea*. J. Gen. Microbiol. 68, 207–220.
- Hawker L.E. et R.J. Hendy, 1963. An electron microscope study of germination of conidia of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Microbiol. 33, 43–46.
- Heim P. 1952. Observations sur le noyau des Ascomycètes. Rev. Mycol. 17, 3–38.
- Istvanffi G. 1902. Etudes sur le rot livide de la vigne (*Coniothyrium diplodiella*). Ann. Inst. Centr. Ampél. Hongr. 2, 288 pp., Pallas, Budapest.
- Marchant R. 1966. Fine structure and spore germination in *Fusarium culmorum*. Ann. Bot. 30, 441–446.
- Reisinger O. 1972. Contribution à l'étude ultrastructurale de l'appareil sporifère chez quelques hyphomycètes à paroi mélanisée. Genèse, modification et décomposition. Thèse, Université de Nancy I. 192 pp, 65 pl.
- et J.C. Guedenet, 1968. Morphologie ultrastructurale et critères taxinomiques chez les Deutéromycètes. I. Les parois sporales chez *Dendryphiella vinosa* (Berk. et Curt.) Reisinger. Bull. Soc. Myc. Fr. 84, 19–26.
- Turian G. 1969. Différenciation fongique. Monographies de Physiologie Végétale, 5, 144 pp. Masson, Paris.

Michel Aragno
Laboratoire de Cryptogamie
Institut de Botanique
11, rue E.-Argand
CH-2000 Neuchâtel 7

